

# **Expression und Funktion von Flightless-I während der Embryonalentwicklung des Hühnchens**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Bea Tamina Redinger-Kraus**

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und  
-Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Bergmann

**und**

dem Institut für Anatomie und Zellbiologie, Abteilung Molekulare  
Embryologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Betreuerin: Prof. Dr. Beate Brand-Saberi

**Expression und Funktion von Flightless-I während der  
Embryonalentwicklung des Hühnchens**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Bea Tamina Redinger-Kraus**

Tierärztin aus Pforzheim

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan                      Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. M. Bergmann

Prof. Dr. B. Brand-Saberi

Tag der Disputation:      16. Juni 2010

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

---

Bea Redinger-Kraus



## Inhalt

1.	Einleitung.....	1
2.	Material und Methoden .....	17
2.1.	Molekularbiologische Methoden .....	17
2.1.1	<i>Flightless-I</i> .....	17
2.1.2	DNA-Sequenzierung .....	17
2.1.3	Transformation kompetenter Zellen .....	17
2.1.4	Bakterienkultur .....	18
2.1.5	Langzeitlagerung von transformierten Bakterienzellen.....	19
2.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA.....	20
2.1.7	Linearisierung und Reinigung.....	22
2.1.8	Herstellung Digoxigenin markierter RNA („Labeling“ und Transkription).....	22
2.1.9	Photometrische Konzentrationsmessung.....	24
2.1.10	Konstrukt für die Überexpression von <i>Flightless I</i> .....	24
2.1.11	Enzymatische Verdauung der DNA.....	26
2.1.12	DNA-Agarose-Gel-Elektrophorese .....	28
2.2.	Gelextraktion der DNA-Fragmente .....	30
2.2.1	Ligation von DNA-Fragmenten.....	30
2.3.	Entwicklungsbiologische Methoden .....	31
2.3.1	Hühnerembryonen.....	31
2.3.2	Elektroporation im Hühnerei.....	31
2.3.3	Sichtbarmachung des Plasmids .....	35
2.3.4	In-situ-Hybridisierung nach Patel.....	36
2.3.5	Dokumentation der Ergebnisse.....	43
2.3.6	Vibratomschnitte .....	43
2.3.7	Antikörperfärbung .....	44
2.3.8	Floating-ISH.....	44
2.3.9	ISH an Paraffinschnitten.....	45
2.3.10	Kryoschnitte .....	48

2.3.11	Fluoreszenz-Doppelmarkierung .....	48
2.3.12	Dokumentation von Gewebeschnitten.....	49
2.3.13	Untersuchung von Zelluntergängen.....	49
3.	Ergebnisse.....	50
3.1.	Herstellung einer RNA-Sonde .....	50
3.2.	Expressionsstudie.....	53
3.2.1	Konstruktion von drei verschiedenen <i>cFlightless-I</i> Fragmenten in pDrive-Vektor.....	57
3.2.2	Expression von <i>Flightless-I</i> .....	60
3.3.	Überexpression von <i>Flightless-I</i> .....	101
3.3.1	Konstruktion des Überexpressionsplasmids .....	101
3.3.2	Überexpression von <i>Flightless-I</i> .....	112
4.	Diskussion .....	127
4.1.	Test auf Zelluntergang.....	128
4.2.	Asymmetrie im Hensenschen Knoten .....	128
4.3.	Filopodien, Neuriten und Wachstumskegel.....	129
4.4.	Expression von <i>Flightless-I</i> in der Muskulatur .....	131
4.4.1	Rumpf.....	131
4.4.2	Gliedmaßen.....	132
4.5.	<i>Flightless-I</i> und <i>Thymosin <math>\beta</math>-15</i> .....	135
4.6.	Smith-Magenis-Syndrom.....	138
5.	Deutsche Zusammenfassung .....	140
6.	English summary.....	142
7.	Danksagung .....	143
8.	Literaturverzeichnis .....	144

## 1. Einleitung

Für die zelluläre Funktion, besonders für die morphogenetischen Prozesse während der Embryonalentwicklung, sind die dynamischen Umbauprozesse des **Aktin-Zytoskeletts** unerlässlich.

Das Zytoskelett ist allen Zellen gemeinsam und reguliert Zellform und Zellmotilität aber auch Zelldifferenzierung. Es besteht in der Hauptsache aus drei miteinander vernetzten Filamentsystemen, den Aktinfilamenten, den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli. Mikrotubuli sind Bestandteil des mitotischen Spindelapparats, beteiligen sich am Aufbau von Flagellen, agieren zusammen mit Motorproteinen beim Vesikeltransport und sind unerlässlich für die Ausbildung der Zellpolarität. Intermediärfilamente sorgen für die mechanische Stabilität der Zelle (Franke, 1993). Die Kontraktion des Skelettmuskels wird durch das aneinander Vorbeigleiten von Aktin- und Myosinfilamenten ermöglicht (Huxley, 1969). Neben den Muskelzellen sind auch alle anderen Zellen des Körpers auf Aktinfilamente angewiesen, ohne welche die zellulären Transport- und Lebensprozesse unmöglich wären. In solchen Nichtmuskelzellen findet ein ständiger Umbau der Aktinfilamente statt. Sie durchziehen die Zelle als sogenannte Stressfasern und liegen unterhalb der Plasmamembran als Cortex, einem zarten Geflecht an Aktinfilamenten. Für den Aufbau eines solchen Aktinfilaments lagern sich zunächst in der Nukleationsphase Aktinmonomere zu einem Trimer zusammen, von dem ausgehend die Polymerisation ihren Anfang nimmt. So liegt Aktin in der Zelle entweder als monomeres G-Aktin oder als polymerisiertes F-Aktin vor. Polymerisiertes F-Aktin besitzt einerseits ein Plus-Ende, an dem unter ATP-Verbrauch ein Netto-Zuwachs an Aktin stattfindet und andererseits ein Minus-Ende, an dem es gleichzeitig zur Dissoziation kommt.

Die Regulation der Umbauprozesse im Aktinzytoskelett wird durch Hilfsproteine bewerkstelligt. Der Auslöser für solche Umordnungsprozesse sind externe Signale. Auf diese Weise wird der Zelle ermöglicht, auf die äußeren Umgebungseinflüsse zu reagieren. Dafür besitzen die Zellen auf der Oberfläche Rezeptoren. An den Innenseiten dieser Zellen laufen die Signale bei den Mitgliedern der **Rho-Proteinfamilie der kleinen GTPasen** zusammen, Cdc42, Rac und Rho. Diese Proteine gehören zur Ras-Superfamilie und stellen molekulare Schalter dar, die zwischen einer aktiven, GTP-gebundenen Form und einer inaktiven, GDP-gebundenen Form hin und her schalten können. Aktivierung von Cdc42 löst beispielsweise die Polymerisierung von Aktin und die Bündelung von Filamenten aus, wodurch Filopodien entstehen. Rac führt zur Aktinpolymerisation an den Zellrändern und bildet so blattartige Lamellopodien. Rho sorgt für die Entstehung der sogenannten Stressfasern und Ausbildung von Fokalkontakten (Bryan et al., 2005).

Neben diesen GTPasen werden die Umbauprozesse im Aktinzytoskelett von evolutionär hochkonservierten **Aktin-bindenden Proteinfamilien** wie

- Wiskott-Aldrich-Syndrom (WASP)-Proteine: Thymosin und Ciboulot
- Gelsolin-ähnliche: Flightless-I
- ADF/Cofilin-ähnliche
- Calponin-ähnliche
- Myosin-Motorproteine

ausgeführt (Dominguez, 2004).

Gelsolin stellt den Prototyp der **Gelsolinsuperfamilie** von Aktin-bindenden Proteinen dar. Es wurde nach seiner Funktion, der Gel-Sol-Phasen-Regulierung des Zytoplasmas von Makrophagen, benannt. Mitglieder dieser Familie finden sich von Metazoen über Pilze und Pflanzen bis hin zu den Wirbeltieren in nahezu allen Lebensformen. Gelsolin moduliert den „Cross-talk“ zwischen Membran und Zytoskelett. Bisher wurden 7 Mitglieder der Gelsolinfamilie identifiziert: Gelsolin, Villin, Adseverin, CapG, Advillin, Supervillin und Flightless-I. Allen Mitgliedern der Gelsolinfamilie ist die Gelsolin-ähnliche Domäne (gelsolin-like domain, GLD) gemein. Diese besteht aus einer Einheit einer Drei- oder Sechsfachwiederholung von 125-150 Aminosäuren. Es wird vermutet, dass diese Wiederholungseinheit im Laufe der Evolution aus intragenen Duplikationsereignissen hervorgegangen ist (Archer et al., 2004). Über diese gemeinsame Domäne hinaus, weisen die Mitglieder der Gelsolinsuperfamilie (Abb. 1.1) Domänen am N- und C-Terminus auf, wie zum Beispiel die Kopfstücke von Villin, Supervillin, Advillin und Villin-ähnlichen Proteinen am C-Terminus, sowie die LRR-Domäne von Fli-I und die zusätzliche Domäne von Supervillin für Aktinbindung und Zellkernlokalisierung am N-Terminus (Archer et al., 2005). Die Mitglieder der Gelsolinfamilie agieren als Aktin-bindende Proteine, regulieren auf diese Weise das Aktinzytoskelett und sind deshalb für die Zellmotilität, Kontraktion und Adhäsion von größter Wichtigkeit (Davy et al., 2000). Es wird angenommen, dass sie im Zytoplasma der Zellen bereits bestehende Filamente auftrennen, neue Aktinfilamente bündeln, für die Nukleation verantwortlich sind und das „Capping“ der Enden von schnell wachsenden Filamenten übernehmen (Archer et al., 2005). Mitglieder der Gelsolinfamilie binden monomere Aktinuntereinheiten und fördern deren Polymerisation. Die Polymerisations- und Depolymerisationsfunktion von Gelsolin wird durch den intrazellulären pH und Calcium reguliert, während das „Uncapping“ durch Phosphoinositid und Tyrosinphosphorylierung reguliert wird. In Abwesenheit von Calcium liegt Gelsolin in seiner globulären Konformation vor. Der Anstieg von Calcium oder ein pH-Wert < 6,5 führt zur Öffnung der inaktiven Kugelform und zur Ausbildung der Aktin bindenden Domäne. Es kommt zur Bindung zweier benachbarter Aktinfilamente, wodurch wiederum der Abtrennungsprozess eingeleitet wird

(Kwiatkowski et al., 1999; Silacci et al., 2004). Nach der Abtrennung verbleibt das Gelsolin am +-Ende des Aktinfilaments als Cap. Für das Uncapping bedarf es der Bindung von Gelsolin Phosphatidylinositol-Lipiden und der Prozess der Polymerisation kann einsetzen. PIP2 beispielsweise inhibiert die Aufspaltung der Aktinfilamente, indem es für die Dissoziation des Gelsolins vom Aktin sorgt (Silacci et al., 2004).

Daneben wird vermutet, dass einige Mitglieder dieser Familie in die Regulierung der Transkription mit eingebunden sind. Speziell Gelsolin selbst, Supervillin und Flightless-I agieren als Koaktivatoren für Zellkernrezeptoren.

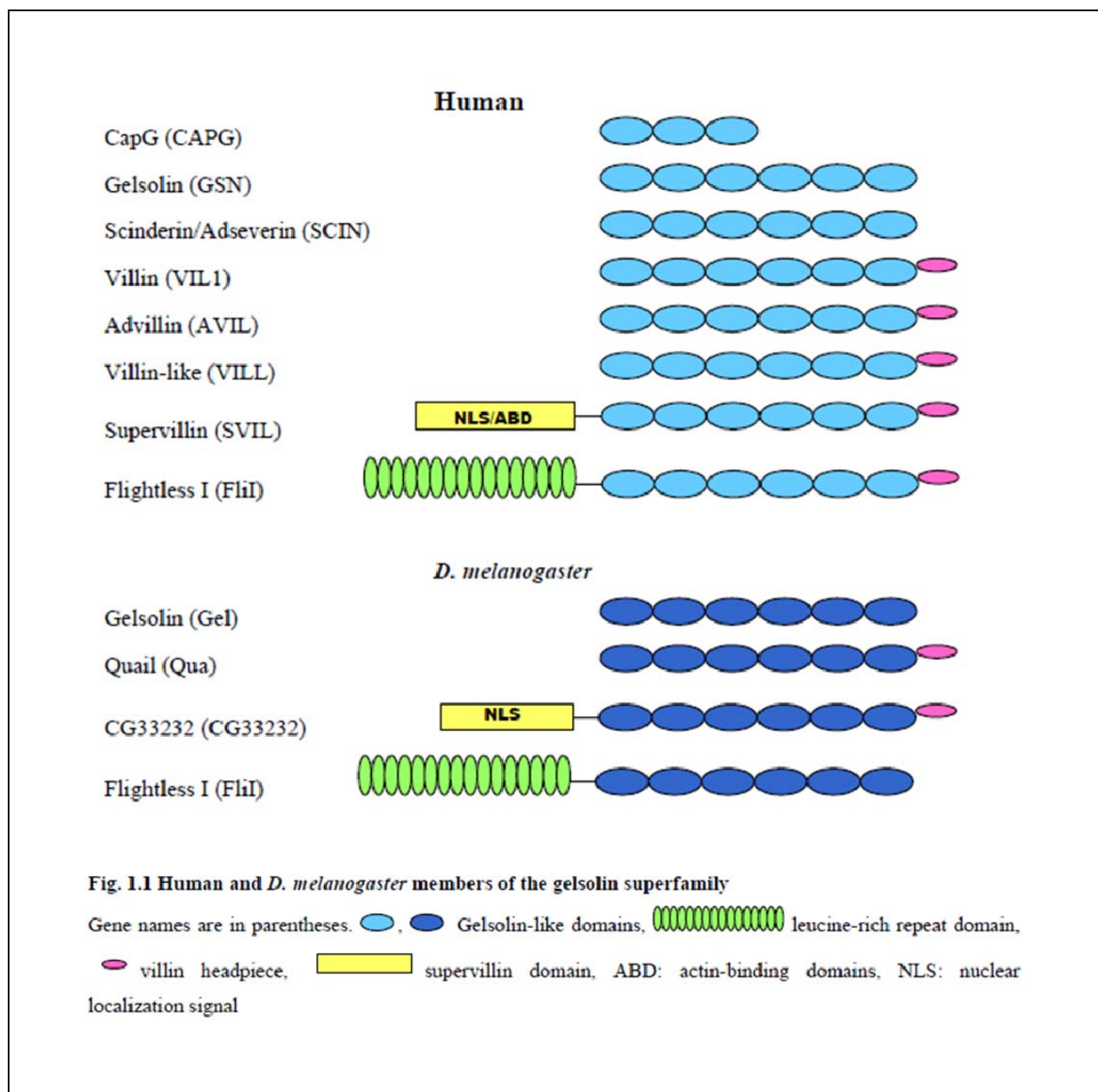


Abb. 1.1 Einige Mitglieder der Gelsolinsuperfamilie in *Drosophila melanogaster* und Mensch (Kremer, Diplomarbeit 2007).

Von Gelsolin existiert sowohl eine zytoplasmatische Form als auch eine Plasmamaisoform, welche in den Extrazellularraum sezerniert wird. Die höchsten Konzentrationen von Gelsolin wurden im Herzen gefunden, gefolgt von Zwerchfell und Lunge. Die übrige Skelettmuskulatur, Nieren und Hoden weisen im Vergleich dazu eine geringere Expression auf. Adseverin findet sich während der Embryonalentwicklung im Knochen, in den Nierentubuli und intestinalen Mikrovilli. CapG wird im Plattenepithel, in Nierenmark und Nebennieren, in Milz und in der sich entwickelnden Hirnrinde exprimiert. Eine starke Expression findet sich in Herz, Uterus, Lunge und Niere.

Mit einer Übereinstimmung von 52% und einer Ähnlichkeit von 69% in der Aminosäuresequenz zwischen *C.elegans* und Mensch ist Flightless-I das am höchsten konservierte Mitglied der Gelsolinfamilie (Archer et al., 2004). Durch Northern-blotting konnte *Fli-I* im menschlichen Herzen, Gehirn, Plazente, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas nachgewiesen werden. Die stärkste Expression fand sich dabei im Skelettmuskel, gefolgt von Herz und Lunge (Campbell et al. 1997).

Die Untersuchung von Mutationen, die bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* Flugunfähigkeit verursachen, führte zur Entdeckung von **Flightless-I**, einem neuen Mitglied der Gelsolin-Superfamilie von Aktin-bindenden Proteinen. In speziesübergreifenden Analysen fanden sich Orthologe dieses Gens in *Caenorhabditis elegans*, Maus und Mensch (Campbell et al., 1997). Sein homozygoter Knock-out führt in einem frühen Stadium der Entwicklung sowohl in Mäusen als auch in Fruchtfliegen zur Letalität der Embryonen.

Das Flightless-I-Protein besitzt zum einen eine gelsolin-ähnliche Domäne am C-terminalen Ende (3'-Ende) und zum anderen 16 „tandem leucine-rich repeats“ (LRR) am N-Terminus (5'-Ende). Die gelsolinähnliche Domäne besteht aus zwei großen duplizierten Domänen. Jede dieser Domänen besteht ihrerseits wiederum aus drei Wiederholungssequenzen von 125-150 Aminosäuren. Auf diese Weise bilden sie die sechs Segmentwiederholungen der Gelsolin-ähnlichen Domäne (g1-6) (Claudianos und Campbell, 1995). Die 16 Tandem-Wiederholungen, die das LRR-Motif bilden, bestehen jeweils aus 23 Aminosäuren. Es konnte gezeigt werden, dass die Gelsolin-ähnliche Domäne direkt mit Aktin interagiert (Kwiatkowski, 1999). Die LRR-Domäne dagegen dient in vielen Proteinen der Protein-Protein-Interaktion entweder als direkter Ligand oder als Co-Aktivator, um die Bindungsaffinität oder Spezifität des Liganden zu verstärken (Liu und Yin, 1998). So spielen LRR-Proteine eine Rolle bei Transkription und Signaltransduktion. Dies zeigt, dass Flightless-I zwei Proteinfamilien miteinander verbindet. Zum einen die Gelsolinfamilie, mit ihrer Fähigkeit Aktin zu binden, und zum anderen die Familie der LRR-Proteine, welche die Protein-Protein-Interaktionen steuern.

Als Reaktionspartner für Flightless-I konnten für die LRR-Domäne zwei menschliche Proteine, LRRFIP1 und LRRFIP2, und ein Protein in der Maus, FLAP1, identifiziert werden (Fong und de

Couet, 1999; Liu und Yin, 1998; Wilson et al., 1998). Diese Proteine weisen eine starke Ähnlichkeit in ihrer Sequenz auf und sind reich an  $\alpha$ -Helices und Coiled-Coil-Strukturen wie sie auch in Myosinen, Tropomyosinen und zahlreichen Intermediärfilamenten vorkommen (Fong und de Couet, 1999). Coil-Motive sind normalerweise in Protein-Proteininteraktionen mit eingebunden und interagieren indem sie Homo- oder Heterodimere bilden (Lupas, 1997). LRRFIP1 und 2 werden entweder unterschiedlich exprimiert und binden in unterschiedlichen Geweben unabhängig voneinander an die Fli-I-LRR oder interagieren kompetitiv oder kooperativ in demselben Gewebe (Fong und de Couet, 1999). In vitro und in vivo konnte eine Kreuzreaktion zwischen FLAP1 und Fli-I-LRR nachgewiesen werden (Liu und Yin, 1998). FLAP1 wird in Herz und Skelettmuskel exprimiert, desweiteren findet es sich in Niere, Lunge und Dünndarm (Liu und Yin, 1998).

Bisher konnte gezeigt werden, dass sowohl FLAP1 als auch LRRFIP2 eine Rolle im  $\beta$ -Catenin-Signalweg inne haben. Exogen zugeführtes FLAP1 aktiviert die  $\beta$ -Catenin abhängige Transkription (Lee und Stallcup, 2006) und LRRFIP2 bindet in Säugetierzellen und Xenopus-Embryonen das Protein Disheveled (dvl) und aktiviert so den „canonical Wnt pathway“ einen Signalweg, der für die Embryonalentwicklung sowie Achsenformation und Gewebekonstruktion unerlässlich ist (Liu et al., 2005; Lee und Stallcup, 2006). Durch die Bindung von Disheveled (dvl) steigt der zelluläre Gehalt an  $\beta$ -Catenin an und die  $\beta$ -Catenin abhängige Transkription wird aktiviert.

Neben der Wnt-gesteuerten Genexpression kam es in den Xenopus-Embryonen nach Injektion von LRRFIP2 zur Bildung einer zweiten Körperachse, die neben einem zweiten Neuralrohr und einem zweiten Notochord in ihrem Aufbau und Aussehen völlig identisch mit der primären Körperachse war (Liu et al., 2005). Es liegt die Vermutung nahe, dass LRRFIP2 upstream von  $\beta$ -Catenin agiert.

Darüberhinaus gelang es, (Davy et al., 2000) eine Kollokalisierung von Flightless-I mit  $\beta$ -Tubulin und Aktin-basierten Strukturen nachzuweisen. Flightless-I kollokalisiert mit Aktin-reichen Strukturen in parasymphatischen Neuronen des Hühnchens, in Maus-Blastozysten und in Zellularisationsstrukturen von *D. melanogaster*. In migrierenden Swiss 3T3 Fibroblasten kollokalisierte menschliches Fli-I mit Mitgliedern der kleinen GTPase-Familie Ras, RhoA und Cdc42, die in der Lage sind GTP zu binden (Davy et al., 2000; Goshima et al., 1999). Es gelang im Jahr 2000, die Lokalisation des Fli-I-Proteins in neuronalen Zellkörpern, in Neuriten und in deren Filopodien und Wachstumskegeln nachzuweisen. Hauptsächlich lokalisiert Flightless-I dabei im Zellkern, aber nach Aktivierung mit Serum findet eine Translokation ins Zytoplasma und die Zellperipherie statt. Es zeigte sich, dass dieses Fli-I-basierte Netzwerk nicht identisch ist mit der Ausbildung von Stressfasern (Davy et al., 2000).

Die LRR-Domäne von *C.elegans*-Fli-I assoziiert direkt mit Ras. Die Gelsolin-ähnliche Domäne von Ce-Fli-I und humanem Fli-I ist in der Lage, Ca-unabhängig G-Aktin zu binden und kann F-

Aktin sowohl binden als auch abtrennen. Auf diese Weise könnte Fli-I durch Ras in die Regulation des Zytoskeletts eingreifen (Goshima et al., 1999).

Aufgrund dieser Entdeckungen wird Flightless-I eine „Brückenrolle“ zugedacht, die das Aktinzytoskelett der Zellen mit bisher noch unidentifizierten Molekülen der Signaltransduktion verknüpft und somit direkt in die Zellregulation eingreift.

Zwar konnte in Säugetierzellen noch keine andere Funktion als die direkte Aktinbindung für Flightless-I nachgewiesen werden, dennoch besteht Grund zu der Annahme, dass Flightless-I eine entscheidende Rolle in Zellkernrezeptor-vermittelten Signaltransduktionswegen zukommt (Archer et al., 2004; Lee et al., 2004). Einige Mitglieder der Gelsolinfamilie sind Bestandteil von Zellkernrezeptor-vermittelten Signaltransduktionswegen. Gelsolin selbst sowie Supervillin interagieren mit dem Androgenrezeptor, während Flightless-I als Koaktivator in Oestrogenrezeptoren und in der Thyroidhormonrezeptor vermittelten Transkription eine Rolle spielt. Dabei ist Flightless-I Teil eines großen, Oestrogenrezeptor- assoziierten Koaktivator-Komplexes (Abb. 1.2) und interagiert mit dem Zellkernrezeptor selbst, mit den Koaktivatoren des Zellkernrezeptors CARM1, GRIP1, BAF53 und mit Aktin (Archer et al., 2004).

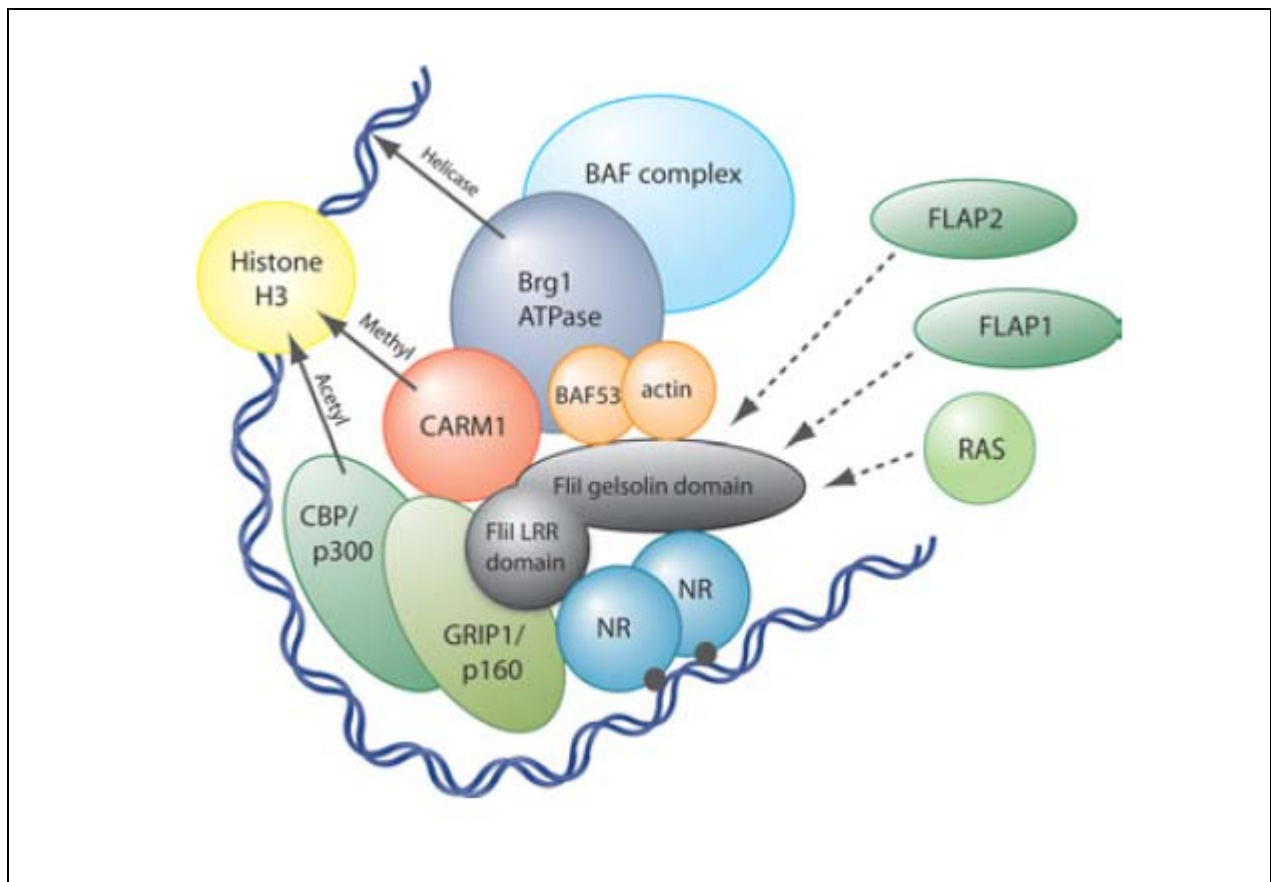


Abb. 1.2 Rolle von Flightless-I im Oestrogenrezeptor- assoziierten Koaktivator-Komplex schematisch verdeutlicht (Archer et al., 2004).



Aktin-bindende Proteine wie Flightless-I sind auch in den Prozess der Wundheilung mit eingebunden. Dies umfasst die Fortbewegung von epidermalen Keratinozyten mit Hilfe von Lamellopodien während der Wundreepithelialisierung, das Einwandern von Entzündungszellen, die Migration von dermalen Fibroblasten, die für die Ablagerung und das Remodellieren der extrazellulären Matrix verantwortlich sind, sowie die dermale Kontraktion an den Wundrändern (Cowin et al., 2007). Nach Schürfwunden steigt zwar die Expression von Flightless-I in Fibroblasten und Keratinozyten an, aber erstaunlicherweise zeigen *Fli-I* homozygote Mäuse eine verschlechterte Wundheilung und dem gegenüber heterozygote Mäuse eine deutlich verbesserte Wundheilung. Durch eine erhöhte epitheliale Migration und erhöhte Wundkontraktion kam es bei *Flightless-I* heterozygoten Mäusen zu einer schnelleren Verkleinerung der Wunden. Die Wundbereiche wiesen eine erhöhte Expression an Myofibroblasten auf. Demgegenüber zeigten verletzte Mäuse mit *Fli-I* Überexpression eine verschlechterte Wundheilung. Die Wundbezirke waren größer, es kam zu reduzierter Zellproliferation und verzögerter Reepithelialisierung. Die Wundkontraktion war verzögert. Antikörper gegen die LRR-Domäne von Fli-I sorgten für eine deutlich verbesserte Wundheilung.

Zunächst nahm man an, dass Flightless-I ein rein intrazelluläres Protein sei, aber neuen Erkenntnissen zufolge wird in Zellkultur Fli-I von Fibroblasten auch sezerniert (Cowin et al., 2007). Andere Familienmitglieder, wie zum Beispiel Gelsolin, werden ebenfalls sezerniert. Hierbei dient das Gelsolin der Reinigung von im Extrazellularraum freiliegendem Aktin oder von Aktin, welches infolge von Gewebeverletzungen in die Zirkulation entlassen wurde (Lee und Galbraith, 1992).

Bei einer Untersuchung an Mäusen stellte sich heraus, dass in der alternden Haut die Expression von Flightless-I in Epidermis und Wundmatrix signifikant ansteigt. Das Altern verschlechtert die negativen Effekte von Fli-I auf die Wundheilung. Eine besonders schlechte Wundheilung zeigte sich in weiblichen Mäusen. Dagegen kam es bei männlichen Mäusen zu einer Hochregulierung von TGF- $\beta$ 1. Dieses Phänomen konnte vor allem bei alten, männlichen Tieren mit *Fli-I* überexprimierenden Wunden festgestellt werden. Da Fli-I als Koaktivator des Oestrogenrezeptors fungiert, sind geschlechtsspezifische Effekte durchaus denkbar. Tatsächlich konnte durch eine ansteigende Konzentration von  $\beta$ -Oestradiol auf Haut-Fibroblasten und Keratinozyten eine verstärkte Fli-I-Expression und Translokation von Fli-I aus dem Zytoplasma in den Nukleus beobachtet werden (Adams et al., 2008).

Desweiteren besteht Grund zu der Annahme, dass Fli-I eine wichtige Rolle in Signalnetzwerken spielt, die das angeborene Immunsystem regulieren, indem Fli-I IL-1/TR4 herunterreguliert und so den Toll-like-Rezeptor-Signalweg des Immunsystems beeinflusst (Wang et al., 2006).

Beim Menschen kommt es nach Mutation des Genortes von *Flightless-I* nach Mikrodeletion von Chromosom 17 zum **Smith-Magenis-Syndrom**. Das Syndrom wurde in den frühen 1980er Jahren von den beiden Gentechnikerinnen Ann Smith und Ellen Magenis entdeckt (Smith et al., 1986). Beim Menschen konnte *Flightless-I* im kritischen Bereich von Chromosom 17 (17p11.2) lokalisiert werden, in dem Patienten mit Smith-Magenis-Syndrom (SMS) zerstörte Areale aufweisen. Die Deletionen verursachen Entwicklungsstörungen sowie mentale Retardierung der Betroffenen (Chen et al., 1995). Solche schwerwiegenden Veränderungen weckten das Interesse, die Rolle von *Flightless-I* und seinen Reaktionspartnern genauer zu analysieren.

Es liegen Gründe zu der Annahme vor, dass es sich bei SMS um ein „Contiguous gene syndrome“ handelt. Dies bedeutet, dass ein Syndrom vorliegt, an dessen Merkmalsausprägung mehrere benachbarte Gene beteiligt sind, die unabhängig voneinander zum Phänotyp beitragen. Die Chromosomenaberrationen und Mutationen umfassen dabei insbesondere Deletionen und seltener auch Duplikationen. Menschen mit SMS weisen eine interstitielle Mikrodeletion von 3,7-Mb auf, die am kurzen Arm von Chromosom 17 in Bande p11.2 zu einer partiellen Monosomie führt (Smith et al., 1986). Genau in diesem, für SMS kritischen Bereich, liegt das menschliche Homolog von *Flightless-I*. Es handelt sich dabei um eine hemizygot Deletion.

90% der SMS-Erkrankungen werden durch Deletionen verursacht, wobei der Defekt vor allem durch Mutationen im *RAI1-Gen* ausgelöst werden kann. Die fehlende Region beherbergt jedoch mehrere verschiedene Gene. Insgesamt konnten 13 verschiedene Gene identifiziert werden, die in den kritischen Deletionsbereich von SMS fallen. Ausschlaggebend ist wahrscheinlich vor allem der Verlust des *RAI1-Gens* (*retinoic acid inducible-1 Gen*, beteiligt an Schizophrenie) (Toulouse et al., 2003). Weitere fehlende Gene führen zu individuellen Unterschieden in der Merkmalsausprägung.

Duplikationen im kritischen Bereich werden durch ein ungleiches meiotisches Cross-over in der elterlichen Keimbahn verursacht. Dabei zeigen die Betroffenen die gleichen Syndrom- und Verhaltensauffälligkeiten wie bei der Deletion; allerdings ist die Symptomatik sehr viel milder ausgeprägt.

Die Betroffenen von SMS weisen Entwicklungs- sowie Wachstumsverzögerungen auf. Neben Schädigungen in zahlreichen Organen kommt es zu Muskelhypotonie und mentaler Retardierung (Greenberg et al., 1991 und 1996). Abbildung 1.3 zeigt eine Liste der Symptome von SMS-Patienten. Verhaltensstörungen sowie neurologische Probleme und craniofaciale Anomalien scheinen durch die Schädigung des *RAI1-Gens* verursacht zu werden, während die anderen Defekte auf Hemigozytie in anderen Genen zurückzuführen ist. Das fehlende Stück in Chromosom 17 kann unterschiedlich lang sein, wodurch das Syndrom in der Ausprägung unterschiedlich stark ist.

- Entwicklungsverzögerung, Wachstumsverzögerung
- Muskelhypotonie, ungewöhnlich dünne Unterschenkel
- Skelettabnormalitäten: Kurze Statur, kleine, breite Hände; kurze Finger und Zehen (Brachydaktylie), Mittelgesichtshypoplasie mit tiefliegenden Augen (Schlitzaugen), nach unten gebogener Mund, volle Wangen und ein prominentes Kinn (Prognatismus), Brachycephalie, Lippenspalte u./o. Gaumenspalte, Skoliose, auffälliger Gang, Pes planus oder Pes cavus, Tiefe Sehnenreflexe schwer auslösbar, Schmelzdysplasie
- Lernbehinderung, kognitive Behinderung, mentale Retardierung (IQ 20-78, meist 40-54), Gehirnanomalien: Ventriculomegalie
- Ungewöhnlich geformte Ohren, Chronische Ohrentzündungen und Schwerhörigkeit
- Kurzsichtigkeit, Netzhautablösung, Strabismus, Brushfield-Spots = kleine weiße Flecken der Iris bei Down-Syndrom
- Sprachliche Verzögerung, tiefe, heisere Stimme
- Herzfehler, Herzgeräusch
- Nieren-, Harnleiter- und Blasenprobleme, Verdopplung der Ureteren
- Gelbsucht
- Trockene Haut
- Übergewicht
- Verminderte Schmerzempfindlichkeit
- Gestörtes Temperaturempfinden
- Teils erhebliche Ein- und Durchschlafstörungen, tagsüber oftmals sehr müde
- Verhaltensstörungen z.B.: Hyperaktivität, Selbstverletzendes Verhalten wie etwa Schlagen des Kopfes gegen Wände, Beißen in die Hände, Picken an Haut und Narben, Abziehen der Finger- und Zehennägel (Onychotillomania), Einführen von Fremdkörpern in Ohren und Nasen (Polyembolokoilomania), Wutausbrüche, destruktive und aggressive Verhaltensweisen, Erregbarkeit, Selbstumarmung, Drücken der Hand bei Aufregung
- Jugendliche und Erwachsene: „lick and flip“ Verhalten = Ablecken der Finger und stereotypes Umblättern von Zeitschriften und Büchern
- Verhaltensweisen wie sie bei vielen Menschen mit Autismus beobachtet werden: Angst vor Berührung, Unfähigkeit zu sprechen, starkes Bedürfnis nach Routine und Gleichförmigkeit im Alltag

Abb. 1.3 SMS-Symptome (Greenberg et al., 1991 und 1996)

Ein anderes Mitglied der Aktin-bindenden Proteinfamilien ist das **Thymosin**. Bei den  $\beta$ -Thymosinen aus der Familie der WASP-Proteine sind bisher drei Hauptvertreter bei den Wirbeltieren bekannt. Dies sind Thymosin $\beta$ -4, Thymosin $\beta$ -10 und Thymosin $\beta$ -15. Ciboulot ist

das Pendant der  $\beta$ -Thymosine in *Drosophila*. Von Thymosin $\beta$ -4 ist bekannt, dass es die Zelle verlassen kann, um Effekte auf benachbarte Zellen zu vermitteln. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Gastrulation, Angiogenese, Ganglien- und Gehirnentwicklung sowie bei der Federbildung. Thymosin $\beta$ -15 wird am stärksten in Skelettmuskulatur und ZNS exprimiert. Alle  $\beta$ -Thymosine werden bei Mensch und Ratte mit Metastasierungsprozessen in Verbindung gebracht. Die Vermutung, dass die Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch Aktin-bindende Proteine entscheidende Einblicke in Embryonalentwicklung und Metamorphose geben könnte, führte zur Untersuchung von *Flightless-I* in der Neurogenese von *Drosophila melanogaster* (Kremer, Diplomarbeit 2007).

Im Genom von *Drosophila melanogaster* findet sich *Flightless-I* auf dem X-Chromosom in der Subdivision 19F (De Couet et al., 1995). Der Bereich umfasst 67kb und besteht aus 1256 AS mit einem Gewicht von 143 672 Da und 12 Transkriptionseinheiten: *tweety*, *flightless*, *dodo*, *penguin*, *small optic lobes*, *innocent bystander*, *wacław*, *bobby sox*, *sluggish*, *Helicase*, *misato*, und *la costa* (Abb. 1.4). Im Vergleich dazu umfasst das menschliche *Fli-I* 14kb (Campbell et al., 1997).

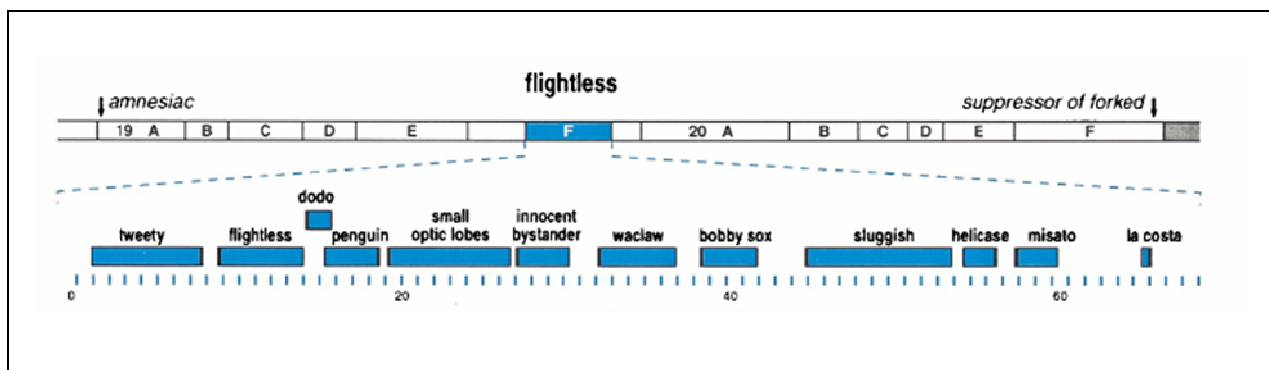
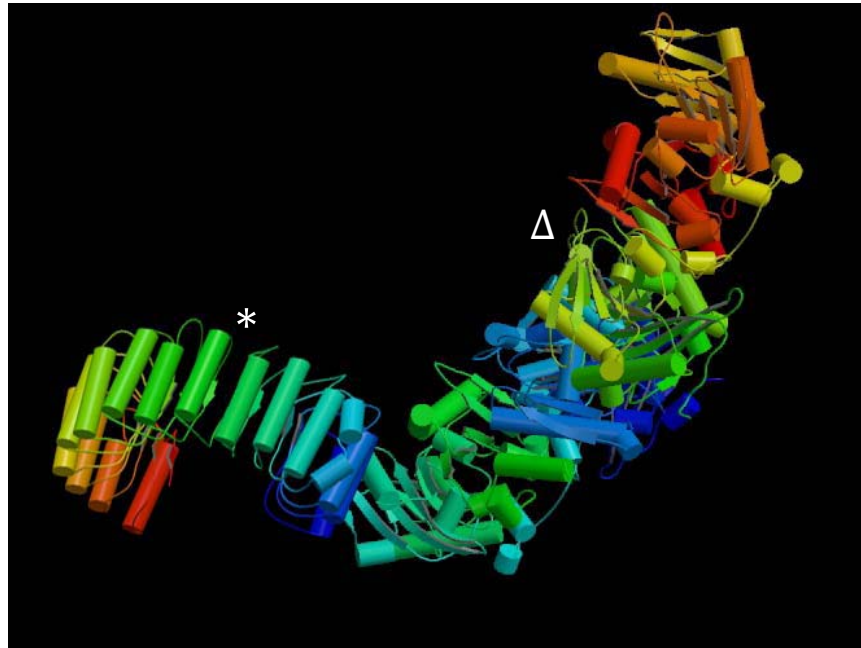


Abb. 1.4 Präsentiert die Lage von *Flightless-I* und seinen 12 Transkriptionseinheiten im Genom von *Drosophila melanogaster* (Maleszka et al., 1998). Es ist zu vermerken, dass nur die Deletionen von *Fli-I*, *Hlc* und *mst* zum Tod der Embryonen führen.

Das *D. melanogaster* Flightless-I-Protein besteht aus 1256 Aminosäuren. Seine LRR-Domäne gleicht am stärksten der LRR-Domäne der Adenylatcyclase in Hefen, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass im Laufe der Evolution eine Rekombination zwischen einem Gen, das für ein Gelsolin-ähnliches Protein kodiert, und einer der Adenylatcyclase verwandten LRR-Domäne, stattgefunden hat (Archer et al., 2004). Die LRR-Domäne dient der Protein-Protein-Interaktion. Meist besteht diese Domäne aus 20-30 Aminosäuren, die 2-42fach wiederholt werden. Die räumliche Anordnung erinnert an ein Hufeisen oder eine Doughnutform mit einer parallelen  $\beta$ -Faltblattstruktur auf der konkaven Seite und zahlreichen anderen Sekundärstrukturen auf der konvexen Seite (Abb. 1.5) (Enkhbayar et al., 2004).



Legende:      \*      N-Terminus mit der LRR-Domäne in Hufeisenform  
                  Δ      C-Terminus mit der gelsolinähnlichen Domäne (Sechsfachwiederholung)

Abb. 1.5      Hypothetisches 3D-Modell des *Flightless-I*-Proteins erstellt von Prof. de Couet aus Daten für die Proteinstruktur von Gelsolin und RNase-Inhibitor (De Couet et al., 1995)

Proteine mit LRR-Domäne finden sich im Extrazellularraum, im Zytoplasma, im Zellkern und transmembranär. Sie sind Bestandteil vieler biologischer Funktionen wie Hormon-Rezeptor-Interaktion, Signaltransduktion, Zellentwicklung, Enzyminhibierung, bakterieller Virulenz, DNA-Reparatur, RNA-Reifung, Zelladhäsion und zellulärem Traffick (Kobe und Kajava, 2001). Dabei bindet die LRR-Domäne entweder direkt als Ligand oder als (sekundärer) Co-Aktivator, um die Bindungsaffinität oder Spezifität des Liganden zu erhöhen (Liu und Yin, 1998).

Schwache Mutationen von *Flightless-I* führen bei *D. melanogaster* zu Flugunfähigkeit, wohingegen schwere Mutationen auf Höhe des Larven- oder Puppenstadiums tödlich verlaufen. Homozygote Mutanten für *Flightless-I* wiesen keinerlei Defekte auf, wenn durch die Zufuhr an maternalem Protein aus dem Wildtyp-Gen eine normale Entwicklung bis zum Larvenstadium ermöglicht wurde. Ohne maternales Produkt starben die Embryonen infolge einer fehlerhaften Zellularisation im Blastodermstadium ab (Davy et al., 2000; Straub et al., 1996). Für eine regelrechte Zellularisation ist ein intaktes Aktin-Zytoskelett unabdingbar. Bei *Flightless-I*-Nullmutanten reihen sich die Nuklei zunächst wie gewöhnlich entlang der Eischale aneinander, bleiben aber dann nicht in ihrer Position und es kommt zu abnormalen mesodermalen Invaginationen und einer fehlerhaften Gastrulation, die schließlich mit dem

Tod endet. Eine maternale Zufuhr von Flightless-I-Protein ermöglicht eine angemessene Verteilung von Aktin entlang des Membrannetzwerkes, was den Embryonen ein Überleben bis zum Larven- oder Puppenstadium ermöglicht. Desweiteren kommt es bei homozygoten Knockout-Mutanten durch Unterversorgung von Flightless-I-Produkt von maternaler Seite zu Störungen in der frühen Embryonalentwicklung. Miklos und de Couet fanden bei der Analyse der Mutationen drei Typen von Mutanten: *Flightless-I<sup>3</sup>*, *Flightless-O<sup>2</sup>* und *Standby* in Subdivision 19F. Herbeigeführt wurden die Mutationen im Experiment mit Ethyl-Methan-Sulfonat, was für gewöhnlich Punktmutationen verursacht. Außerdem wurde eine vierte Mutante namens *Grounded* entdeckt, die nahe der Basis des X-Chromosoms liegt und sich distal des zytogenetischen Intervals 18F-20F findet (Miklos und De Couet, 1990).

Eine deutliche Auswirkung der Mutation von *Fli-I* ist die Zerstörung der indirekten Flugmuskulatur (Abb. 1.6).

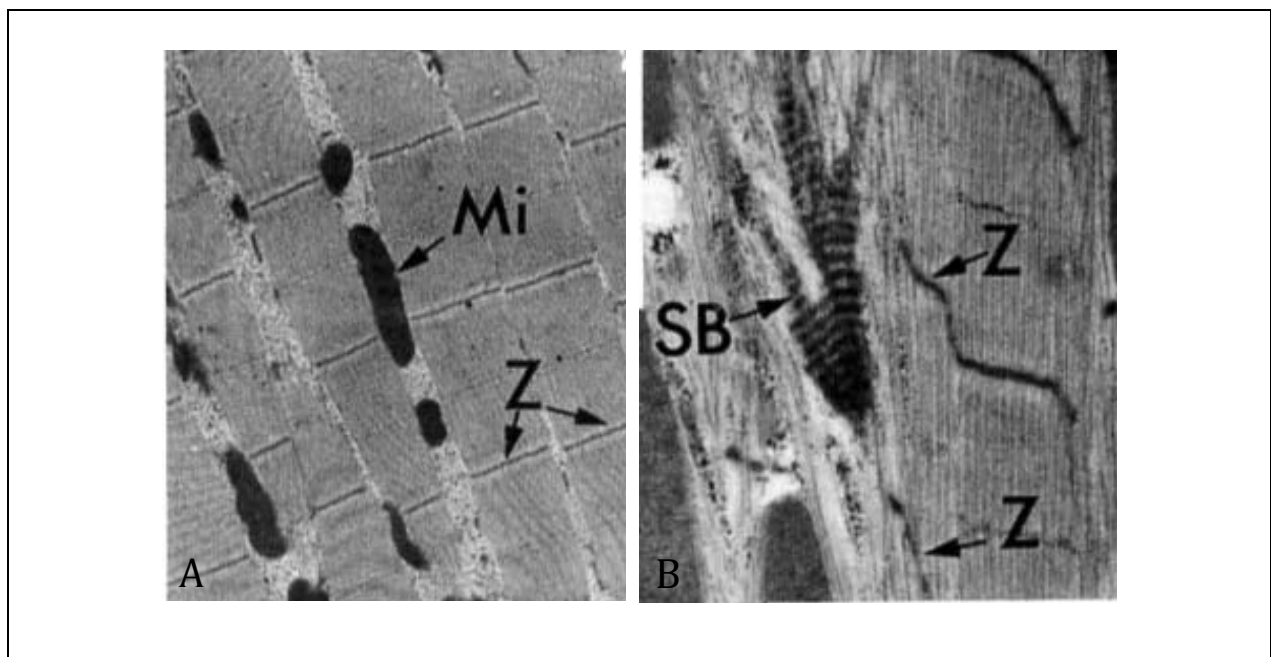


Abb 1.6 Abbildung A zeigt einen Längsschnitt durch einen gesunden „langen Rückenmuskel“ von *D. melanogaster*.

In Abbildung B ist die zerstörte Muskulatur einer *Flightless-I*-Mutante zu sehen (Miklos und de Couet, 1990).

(Mi: Mitochondrien, Z: Z-Streifen, SB: „striated bundles“ = gestreifte Bündel, assoziiert mit dünnen Filamenten)

Im Vergleich der beiden Bilder ist deutlich zu sehen, dass die parallele Anordnung der Myofilamente nach Mutation von *Flightless-I* verloren geht. Die hexagonale Struktur der Sarkomere ist zerstört. Es finden sich keine Bündel mehr von dicht gepackten Aktin- und Myosinfilamenten. Die Mitochondrien tauchen verstreut im Gewebe auf, anstatt Längssäulen

entlang der Myofibrillenbündel zu bilden. Es kommt zu einer irregulären Anordnung der Z-Banden. Außerdem finden sich im Bereich der Z-Banden gestreifte Bündel aus dünnen Aktinfilamenten (Miklos und de Couet, 1990). Desweiteren waren *Flightless-I* Mutanten nicht in der Lage, aus ihren Eiern zu schlüpfen, und nach manueller Entfernung der Eihüllen zeigte sich, dass die Hinterbeine der Tiere in einer Membran gefangen waren. Nach Entfernung der Membranen zeigten die Fliegen zitternde Bewegungen und Muskelzuckungen. Sie waren nicht im Stande, ihre Beine zu koordinieren und konnten auch die Flügel nicht ausbreiten. Im Pilzkörper der Tiere kam es zu Fehlentwicklungen und es tauchten Fliegen mit rauen und fehlpigmentierten Augen auf. In den Flügeln fanden sich zusätzliche Venen.

Gain-of-Function- und Loss-of-Function-Untersuchungen zeigten bei *Drosophila* Störungen der Gehirn- und Skelettmuskelentwicklung, ähnlich wie beim Menschen. Nach Überexpression von *Flightless-I* tauchten Fliegen mit „rauen“ Augen auf. Die Struktur der Rhabdomere in den Augen war zerstört. Es kam einerseits zu überzähliger Rhabdomerbildung und andererseits zu Dissorganisation der Rhabdomerstruktur (Kremer, Diplomarbeit 2007). Desweiteren wiesen die Manipulationen von *Flightless-I* (Gelsolin-Familie) und *Ciboulot* (WASP-Familie, Pendant zum *Thymosin* der Wirbeltiere) erstaunliche Parallelen auf. Die Überexpression der beiden Gene führte in beiden Fällen zur Verschmelzung der  $\beta$ -Loben der Pilzkörper (Boquet et al., 2000; Kremer, Diplomarbeit 2007). Der Pilzkörper ist bei *Drosophila* eine Schlüsselstruktur des olfaktorischen Systems und darüber hinaus das Pendant für Gedächtnis und Lernen. Beim Menschen werden diese Funktionen dem Hippokampus zugeschrieben.

Diese Defekte von *Fli-I*-Mutationen in zahlreichen Organen zusammen mit den parallelen Befunden nach Überexpression von *Ciboulot* bzw. *Thymosin* und *Flightless-I* führten zur genaueren Analyse von *Flightless-I* während der Embryonalentwicklung.

Bei Vertebraten durchläuft der Embryo das Stadium der Gastrulation. Innerhalb dieses Entwicklungsschrittes entsteht das Mesoderm. Diese dritte Schicht, aus der später die Organe des Körpers hervorgehen, entsteht zwischen Entoderm und Ektoderm. Sie wird je nach Lage in vier Kategorien unterteilt: Das zentral gelegene Chordamesoderm in der Mitte, flankiert vom paraxialen Mesoderm rechts und links, an das sich dann nach lateral folgend das intermediäre Mesoderm anschließt und schließlich außen das laterale Seitenplattenmesoderm. Mit der Rückbildung des Primitivstreifens und der Entstehung der Neuralfalte beginnt auch das paraxiale Mesoderm sich aufzuteilen. Zunächst wird das paraxiale Mesoderm unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors Paraxis epithelialisiert. Danach beginnt es sich zu formatieren und seine Zellen fangen an, kompakte Stränge entlang des Neuralrohrs zu bilden, die sogenannten Somitomeren (Gilbert, 2006).

Von diesen Somitomeren schnüren sich im Laufe der Entwicklung von cranial nach caudal die **Somiten** ab. Diese werden im paraxialen Mesoderm nach dem „clock and wave“-Model gebildet. Dabei entsteht, durch die Signalwege von Notch und Wnt vermittelt, ein

oszillierendes Signal (the clock) und ein in cranio-caudaler Richtung verlaufender Gradient von FGF (the wave) entlang des Embryos und formt die Grenzen der Somiten. Notch-1 wird oszillierend exprimiert und legt die Grenzen der Somiten fest, so dass es zu einer gleichmäßigen Form und Größe der Somiten kommt (Gilbert, 2006).

Hox-Gene sorgen für die Segmentidentität in cranio-caudaler Richtung. Im Laufe der Entwicklung reifen die Somiten heran und bilden das Sklerotom aus, aus welchem später die Wirbel und die Rippenknorpel entstehen, das Myotom, das die Muskulatur des Rückens, der Rippen und der Gliedmaßen formt, und das Dermatome, aus dem später die Haut hervorgeht. Unter dem Einfluss des von der Chorda dorsalis und dem ventralen Neuralrohr sezernierten Signalmoleküls Sonic hedgehog (Shh), kommt es zur epithelio-mesenchymalen Transition im ventralen Bereich der Somiten. Es kommt zu verminderter Expression von N-Cadherin und der epitheliale Zellverband löst sich auf und bildet Mesenchym. Auf diese Weise entsteht das Sklerotom. Der dorsale Anteil des Somiten bleibt weiterhin epithelial und bildet das Dermomyotom. Während im Sklerotom Pax1 und Pax9 aktiv werden, sind dies im Dermomyotom Pax3 und Pax7. Shh aus Chorda dorsalis und ventralem Neuralrohr reguliert die Expression von Pax1 (Fan und Tessier-Lavigne, 1994). Unterhalb des Dermomyotoms kommt es zur Bildung einer neuen Schicht, dem Myotom. Der verbleibende Anteil des Dermomyotoms wird nun als Dermatome bezeichnet.

Shh und Noggin aus der Chorda dorsalis sorgen für die Ausbildung des mesenchymalen Sklerotoms. Wnt-1 und Wnt-3a aus dem dorsalen Neuralrohr lassen das mediale Dermomyotom entstehen, während Wnt-4, Wnt-6 und Wnt-7a aus dem Ektoderm das laterale Dermomyotom formen (Münsterberg et al., 1995; Yusuf und Brand-Saberi, 2006; Stern et al., 1995). Im Dermomyotom kommt es zu einer planaren Zellteilung, bei der die Tochterzellen nebeneinander zum Liegen kommen, und zu einer apiko-basalen Zellteilung, bei der eine der Tochterzellen entweder nach dorsal in die Dermis oder nach ventral ins Myotom verlagert wird.

Die Bildung des **Myotoms** selbst erfolgt in vier Wellen. Die erste Welle postmitotischer Zellen stammt aus der dorsomedialen Ecke des Somiten. Diese Zellen delaminieren und migrieren und bilden so unter dem Dermomyotom das Baugerüst für eine zweite Welle postmitotischer Zellen, die von allen vier Ecken des Dermomyotoms ausgeht. Daraufhin folgt eine dritte Welle an Vorläuferzellen aus der rostralen und caudalen Lippe des Dermomyotoms. Diese Zellen sind mitotisch aktiv. Mit der Deepithelialisierung des zentralen Dermomyotoms erfolgt die vierte Welle an Muskelvorläuferzellen. Diese sind ebenfalls mitotisch aktiv (Ahmed et al., 2006).

Im lateralen Dermomyotom veranlassen umliegende Gewebestrukturen die Expression von Pax3. Pax3 aktiviert dort den Transkriptionsfaktor MyoD. Im medialen Dermomyotom sorgt Myf5 für die Expression von MyoD. Myf5 und MyoD werden auch als Muskelregulations-



faktoren bezeichnet, denn jede Zelle, in der es zur Expression von *Myf5* und *MyoD* kommt, wird zu einer Muskelzelle (Gilbert, 2006).

Es entstehen nicht-migrierende Zellen, die sich dem Myotom anschließen und migrierende Zellen, die über weite Strecken in die Extremitäten, Zunge und Zwerchfell auswandern (Birchmeier und Brohmann, 2000). Auf Höhe der Extremitäten wandern Myoblasten aus dem Dermomyotom in die Arm- und Beinanlagen aus. Zuerst kommt es zur Delamination, dann beginnen die Zellen zu migrieren, bis sie am Zielort schließlich proliferieren und zuletzt in die Differenzierungsphase übergehen, in der das myogene Programm aktiv wird. Die meisten dieser Zellen werden zu Skelettmuskelzellen. Einige jedoch verharren in einem undifferenzierten Stadium und umgeben die reifen Muskelzellen. Diese Zellen bleiben als sogenannte Satellitenzellen im adulten Körper bestehen und sorgen für postnatales Muskelwachstum und Muskelreparatur nach Verletzung.

Muskelvorläuferzellen delaminieren aus dem hypaxialen Dermomyotom und wandern in die Gliedmaße ein. Delamination und Migration hängen von der Anwesenheit von c-met ab. Dieser Rezeptor reagiert mit HGF, auch Scatter Factor genannt. Er wird in mesodermalen Zellen produziert und zeichnet den wandernden Zellen ihre Migrationsroute vor (Dietrich et al., 1999). Die c-met-Transkription ist abhängig von Pax3 (Epstein et al., 1996). Die Muskelvorläuferzellen beginnen erst *Myf5* und *MyoD* zu exprimieren, wenn sie die Extremität erreicht haben.

*MyoD* und *Myf5* bestimmen eine Zelle zur Muskelzelle; sie werden Muskeldeterminationsfaktoren genannt. Die entstandenen Myoblasten beginnen sich unter dem Einfluss von FGF zu teilen. Später fangen Myoblasten an, sich aneinander zu reihen. Mit Hilfe von Metalloproteinasen, wie Meltrin, fusionieren die Myoblasten zu mehrkernigen Myotuben, indem sie ihre Membranen auflösen. In der anschließenden Reifungsphase entstehen fertige Muskelfasern umgeben von Satellitenzellen (Gilbert, 2006).

BMPs aus dem lateralen Mesoderm haben einen negativen Einfluss auf die Myogenese, da sie die Expression von *MyoD* blockieren. Noggin wiederum fungiert als Gegenspieler der BMPs. So wird vermieden, dass Myoblasten sich zu früh und an der falschen Stelle differenzieren.

Für die Untersuchung von Genen während der Embryonalentwicklung bietet sich das Model des Hühnerembryos an. Der Embryo kann dabei in seiner natürlichen Umgebung verbleiben und auch nach Manipulation für mehrere Tage weiterinkubiert werden. Auf diese Weise sind sterile Manipulationen in vivo möglich.

Im Hühnchen wurden bislang *Thymosin $\beta$ -4* und *15* nachgewiesen. *Thymosin $\beta$ -4* wurde während Gastrulation, Angiogenese, Ganglien- und Gehirnentwicklung und bei der Federbildung beschrieben (Dathe und Brand-Saberi, 2004). *Thymosin $\beta$ -15* wird am stärksten in ZNS und Skelettmuskulatur exprimiert. Es konnte sowohl im Myotom als auch später in der oberflächlichen autochthonen Rückenmuskulatur nachgewiesen werden. Außerdem konnte

eine deutliche Expression im Hippokampus des Vogels nachgewiesen werden (Wirsching, Doktorarbeit 2009). Nach Überexpression von *Thymosin $\beta$ -15* kam es zu einer segmentübergreifenden Verschmelzung zwischen den Myotomen der Somiten bei einer gleichzeitigen Hochregulierung der Muskelregulationsfaktoren *MyoD*, *Myf5* und *Pax3*, wohingegen es bei dem Sklerotommarker *Scleraxis* zu einer Herunterregulierung kam. Der Knockdown dagegen verursachte ein Ausbleiben der Elongation der Myotomzellen und Hemmung der Myogenese. Daneben kam es zu einer verminderten Expression von *MyoD* und *Myf5* (Rudloff, Diplomarbeit 2006).

Die Auswirkungen auf die Zelldifferenzierung weisen auf eine essentielle Rolle der Aktin-bindenden Proteine in der Transkriptionskontrolle hin, die bei weitem über die Bedeutung für Zellform und Zellmotilität hinausgehen. Archer et al. (2004, 2005) und Lee et al. (2004) konnten für *Flightless-I* eine ebensolche Beteiligung an der Transkriptionskontrolle beschreiben.

Ausgehend von den bisherigen Befunden von  $\beta$ -*Thymosin* und *Flightless-I* in *Drosophila melanogaster* werden neue Aufschlüsse über die essentiellen Funktionen dieser hochkonservierten Aktin-bindenden Proteine während der Embryonalentwicklung höherer Wirbeltiere erhofft. Gibt es Gemeinsamkeiten in der Rolle von *Thymosin $\beta$ -15* und *Flightless-I* während der Entwicklung? Wenn ja, welche zellulären Prozesse, die über Aktin-Bindung gesteuert werden, erklären die Phänokopien nach Manipulation beider Gene? Darüber hinaus könnten neue Einblicke in die zytologischen Ursachen des Smith-Magenis-Syndroms gewonnen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 *Flightless-I*

Die vollständige Gensequenz von *Gallus gallus Flightless-I* wurde, einkloniert in einen Vektor (*pKS-cFlightless-I*), von Randolph Caldwell (Institut für Molekulare Radiobiologie, Prof. Dr. Jean-Marie Buerstedde, am Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (GSF) in Neuherberg, München) zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2 DNA-Sequenzierung

---

*In einigen Fällen ist es für die Experimente unerlässlich, jede einzelne Base eines Gens zu kennen, in anderen wiederum dient es der einfachen Überprüfung eines von der Industrie bezogenen Plasmids auf dessen Vollständigkeit und Korrektheit. Heutzutage wird für die Sequenzierung im Allgemeinen die Didesoxymethode nach Sanger angewandt. Dabei handelt es sich um eine Kettenabbruch-Synthese. Die DNA wird zunächst denaturiert und anschließend, ausgehend vom passenden Primer, mit der DNA-Polymerase einer der beiden komplementären Stränge verlängert. An Stelle der normalen Nukleotide befinden sich Didesoxynucleosidtriphosphate im Ansatz, von denen jedes durch einen anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Die „fehlerhaften“ Nukleotide besitzen keine OH-Gruppe am 3'-C-Atom und so kommt es zu einem Kettenabbruch. Nachdem die einzelnen DNA-Fragmente mit Hilfe der Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt worden sind, leuchten die ddNTPs am Ende eines jeden DNA-Bruchstücks in unterschiedlicher Farbe auf und mit Hilfe eines Detektors kann ein Chromatogramm erstellt werden.*

---

In einem Eppendorfgefäß wurden 1,5µg des *Flightless-I*-Plasmids bei 50°C 30min lang getrocknet und anschließend zur Sequenzierung verschickt. Nach einigen Tagen wurde von der MWG-Biotech AG das Ergebnis via E-Mail übermittelt.

#### 2.1.3 Transformation kompetenter Zellen

---

*Kompetente Zellen sind Zellen, die in der Lage sind fremde DNA aufzunehmen. In der Gentechnik werden solche Zellen für die Transformation genutzt. Dieser Vorgang beschreibt die Aufnahme freier Plasmid-DNA in bakterielle Wirtszellen.*

*In der modernen Molekularbiologie werden Escherichia coli dazu benutzt, in großen Mengen rekombinante DNA zu erzeugen. Durch einen kurzen Hitzeschock sind die Bakterien dann in der Lage, die durch Restriktion und Ligation künstlich hergestellten DNA-Moleküle aufzunehmen.*

---

Die chemisch kompetenten Zellen, One Shot® Omni Max™2<sup>R</sup> von Invitrogen (Lagerung bei -80°C), wurden auf Eis langsam aufgetaut. 25µl kompetenter Zellen wurden mit 40ng Plasmid-DNA (entspricht 2µl Ligationsgemisch) in einem Eppendorfgefäß vermengt und für 15-30 min auf Eis verbracht. Danach erfolgte für 1 Minute ein Hitzeschock bei 42°C.

100-200µl der Zellsuspension wurden in einer Petrischale mit LB-Medium und Ampicillin-zusatz ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Vor dem Ausstreichen der Zellsuspension musste der Agar für 1h mit 100µl IPTG und 100µl X-Gal behandelt werden.

X-Gal und IPTG
X-Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid, künstlich hergestelltes chromogenes Substrat für β-Galactosidase, β-Galactosidase hydrolysiert X-Gal zu Galactose und einem Farbstoff, welcher an der Luft zu einem tiefblauen Indigofarbstoff oxidiert (=qualitative Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität). Die MCS des Vektors liegt in der Gensequenz der β-Galactosidase, d.h. wenn nun ein Insert eingebracht wird, wird die β-Galactosidase-Sequenz zerstört und das Enzym nicht mehr gebildet → kein blauer Farbstoff mehr → weiße Kolonien.
IPTG: Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, ein Galactose-Derivat, künstlicher Aktivator des Lactose-Operons in E. coli.

#### 2.1.4 Bakterienkultur

*Kulturen von Escherichia coli können in LB-Medium angezüchtet werden. Plasmidtragende Bakterienstämme mit Genen für Antibiotikaresistenzen sollten immer in einem flüssigen oder festen Medium kultiviert werden, das bereits mit dem selektiven Agens beimpft wurde. Dies führt dazu, dass sich die gewünschten, plasmidtragenden Bakterienstämme schneller vermehren als nicht transformierte Zellen.*

*Neben dem selektiven Agens wird den festen Kulturmedien noch X-Gal und IPTG zugesetzt. Transformierte Zellen sind durch das Insert, das im Bereich des lacZ-Gens liegt, nicht mehr in der Lage, X-Gal zu einem blauen Indigo-Farbstoff zu oxidieren. Auf diese Weise sind die transformierten, weißen Kolonien leicht von den blauen Kolonien ohne Insert zu unterscheiden.*

##### 2.1.4.1 Ansetzen der Vorkultur

Von den LB-Platten wurden mit einer sterilen Pipettenspitze positive Klone gepickt und zusammen mit 5ml LB-Flüssig-Medium mit 5µl Ampicillin in ein 14ml Falcon® Rundbodenkulturröhrchen (Becton Dickinson Labware) gegeben. Dieser Ansatz konnte anschließend für 8-16h bei 37°C und 200-250rpm im Schüttelinkubator (innova™4230, New Brunswick

Scientific) inkubiert werden. Das weitere Vorgehen beim Ansetzen der Vorkultur wurde der Anleitung von Machery und Nagel „Plasmid DNA Purification User Manual“ entnommen.

#### 2.1.4.2 Ansetzen einer „Über-Nacht-Kultur“

In einem 250ml Erlenmeyerkolben (Schott) mit seitlichen Einziehungen wurden 100ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit 100µl Vorkultur (=Verdünnung der Vorkultur 1:1000) beimpft und über Nacht bei 37°C und 300rpm inkubiert. Diese speziellen Erlenmeyerkolben dienen der besseren Belüftung (örtlicher Glaswarenlieferant Bruno Kummer, Freiburg).

LB-(lysogeny broth) Medium	
20,0g	LB-Bouillon (Fluka)
Die LB-Bouillon wurde in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst und ein pH von 7,2 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung bei 4°C aufbewahrt.	
Antibiotika wurde nur für Flüssigkulturen und kurz vor deren Gebrauch zugegeben.	
LB-Medium: „lysogeny broth“ ist ein von Giuseppe Bertani entdecktes Nährmedium für <i>E.coli</i> . Zusammensetzung: Hefeextrakt (5g/l), Trypton (10g/l), NaCl (0,5-10g/l), je nach Salzgehalt werden die Medien nach Miller, Lennox oder Luria eingeteilt	

LB-Agar-Platten	
15,0g	LB-Agar (Invitrogen)
Der Agar wurde in 1 Liter ddH <sub>2</sub> O gelöst und bei 121°C für 15min autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50°C konnte das Antibiotikum zugesetzt werden und unter einem Abzug (Hera safe, Heraeus Instruments GmbH) wurden ca. 30ml der warmen Lösung in Petrischalen mit 90mm Durchmesser verteilt. Die fertigen LB-Agar-Platten wurden bei 4°C aufbewahrt.	

LB-Agar pH7,2	
15,0g	LB-Agar (Invitrogen)
Der Agar wurde in 1000ml ddH <sub>2</sub> O gelöst.	

#### 2.1.5 Langzeitlagerung von transformierten Bakterienzellen

*Agarplatten erlauben nur eine kurze Aufbewahrungszeit für E.coli-Kulturen. Nach wenigen Tagen kann es bereits zu Verlusten von Kolonien kommen. Deshalb ist es unbedingt notwendig „Glycerolstocks“ anzulegen, um eine Lagerung für mehrere Jahre zu ermöglichen.*

Eine Stammlösung mit 30% Glycerol (Sigma) in PBS wurde angesetzt und autoklaviert. In einem 1,2ml Kryoröhrchen (Roth) wurden 500µl *E. coli* aus der logarithmischen Phase (exponentielles Wachstum) der Flüssigkultur (= Zellsuspension aus der Vorkultur) mit 500µl

30%iger Glycerol-Lösung durch vortexen (Vibrofix VF1 Electronic, Janke und Kunkel, IKA Labortechnik) gemischt und bei -80°C (Heraeus) eingefroren.

Dieser Stock kann bei Bedarf aufgetaut werden und so die Arbeitsschritte der Transformation ersparen.

### 2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA

---

*Um nach erfolgreicher Plasmid-Vermehrung diese molekularbiologisch nutzen zu können, müssen sie in Reinform vorliegen. Das bedeutet jegliche Entfernung von Bakterienzellresten.*

*Das Vorgehen beruht auf zwei Grundprinzipien:*

- 1. Alkalische Lyse*
- 2. Isopropanolpräzipitation*

*Die DNA-Ausbeute und Qualität hängt stark von der Qualität des Zelllysats ab. Zellen aus Flüssigkultur werden in Tris-Cl-EDTA-Puffer resuspendiert. Dieser enthält bereits RNase A, die störende, zelluläre RNA abbaut. Die Zellen werden mit NaOH/SDS lysiert. NaOH denaturiert sowohl chromosomale und Plasmid-DNA als auch Proteine. Sodiumdodecylsulfat schließt Protein-Komponenten und Phospholipide der Zellmembranen auf. Anschließend wird das Lysat mit einer Kaliumacetat-Lösung neutralisiert. Es entsteht ein unlöslicher Komplex aus Salzen und Detergenz in dem Zellbruchstücke, denaturierte Proteine und chromosomale DNA mit ausgefällt werden, wohingegen die Plasmid-DNA als geschlossener Ring korrekt renaturiert und in Lösung bleibt. Das gereinigte Plasmid wird normalerweise an eine stationäre Phase gebunden, um durch Filtration und Waschschrte die Entfernung von Zellbruchstücken aus dem Lysat zu ermöglichen. Nach Eluierung der DNA kann diese bei Raumtemperatur mit Isopropanol ausgefällt werden, was die gleichzeitige Ausfällung von Salzen deutlich minimiert. Zuletzt wird die DNA an der Luft getrocknet und in einem passenden Puffer wieder in Lösung gebracht.*

---

### 2.1.6.1 Ernte der Bakterienzellen

Durch Pelletieren der Zellsuspension mit anschließender Zellyse und schließlichem Aufreinigen und Ausfällen der DNA mit Hilfe von Säulen und Puffern, konnte die Plasmid-DNA in Reinform gewonnen werden. Bei Bedarf wurde die Plasmid-DNA in DEPC-H<sub>2</sub>O eingefroren (Restriktionsendonukleasen schneiden in H<sub>2</sub>O besser als in Salzen).

Für das praktische Arbeiten standen zwei Präparationsverfahren zur Auswahl:

#### **Minipräparation**

Die Minipräparation eignet sich für nachfolgende Sequenzierung oder analytische Restriktion. Mit Hilfe des QIA prep® Spin Miniprep Kit von Qiagen ist es möglich, hoch aufgereinigte Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 0,5µg/µl in Volumina von bis zu 5ml zu erhalten.

#### **Maxipräparation**

Mit der Maxipräparation ist es möglich, größere Kulturvolumina von bis zu 120ml zu erhalten. Qiagen bietet mit dem QIA filter™ Maxi Kit die Möglichkeit, hoch aufgereinigte Plasmid-DNA in Konzentrationen von 12µg/µl für experimentelle Zwecke zu erlangen. Nach dem Abzentrifugieren der „Über-Nacht-Kultur“ wurde, gemäß dem User manual von Machery und Nagel für Nucleobond Xtra Midi Kit, verfahren und in 100µl EB-Puffer (Qiagen) eluiert.

Kits	
QIAGEN Large Construct Kit	Qiagen
QIAprep spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick gel extraction Kit	Qiagen

DEPC-Wasser	
0,1% (v/v) (=0,1ml)	DEPC (Sigma)
Vor dem Autoklavieren wurde destilliertes Wasser für 1-2h bei 37°C mit DEPC behandelt. Oder: 1l destilliertes Wasser + 1ml DEPC → gut schütteln und über Nacht in den Wärmeschränk bei 37°C, am folgenden Tag dann autoklavieren.	
DEPC: Diethyldicarbonat/ Diethylpyrocarbonat, farblose, klare Flüssigkeit zur Inaktivierung von RNAsen Für die ISH wurden grundsätzlich alle Lösungen mit DEPC behandelt, um das Risiko einer Kontamination mit Ribonukleasen herabzusetzen.	

### 2.1.7 Linearisierung und Reinigung

*Der erste Schritt für die weitere Verarbeitung nach der Transformation ist die Linearisierung. Dabei wird das ringförmige Plasmid mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geöffnet und somit die Grundlage für die spätere Transkription geschaffen.*

#### 2.1.7.1 Protokoll der erfolgten Linearisierung:

	a.S.	S.
Konzentration	0,64µ/µl dsDNA	0,64µ/µl dsDNA
Menge	16µl	16µl
Restriktionsendonukleasen	2µl ECORI	2µl XhoI
Puffer	10µl PufferH(Roche)	10µl PufferH(Roche)
ddH <sub>2</sub> O	72µl	72µl
Gesamt	100µl	100µl
dd H <sub>2</sub> O: doppelt destilliertes Wasser		

Der Ansatz wurde für 2h bei 37°C inkubiert.

### 2.1.8 Herstellung Digoxigenin markierter RNA („Labeling“ und Transkription)

*Digoxigenin (DIG) gehört als Cardenolid zu den pflanzlichen Steroidhormonen. In der Natur findet sich die giftige Substanz in den Blättern des Fingerhuts, Digitalis purpurea.*

*Die Molekularbiologie verwendet DIG für das Markieren von RNA- und DNA-Molekülen. Für die In-situ-Hybridisierung wird DIG an die für die RNA spezifische Base Uridintriphosphat (UTP) gebunden und kann durch einen Anti-Digoxigenin-Antikörper, der mit einem Reporterenzym gekoppelt ist, aufgespürt werden. Da das Digoxigenin als Hapten nur in gebundenem Zustand erkannt werden kann, eignet es sich hervorragend dazu Nukleinsäuren in Geweben sichtbar zu machen.*

*Wenn nun DIG an sein Substrat (RNA/DNA) bindet, triggert es eine Immunantwort, in der die Alkalische Phosphatase, gebunden an den Anti-DIG-Antikörper, die chromogenen Substrate BCIP und NBT zu einem blauen Farbstoff umsetzt.*

Die DNA musste nun in RNA transkribiert werden. Das in DEPC-H<sub>2</sub>O eingefrorene DNA-Plasmid mit der „full length“ von *Flightless-I* wurde bei 37°C aufgetaut und mit geeigneten Restriktionsendonukleasen linearisiert. 1µg der linearisierten Plasmid-DNA wurde anschließend in vitro transkribiert, wobei die RNA-Polymerase (T3, T7, Roche) passend zum jeweiligen



Promotor (T3, T7) ausgesucht wurde. Ebenfalls bei Roche bestellt wurde ein NTP-Mix, das Digoxigenin-markierte UTP enthält.

#### 2.1.8.1 Protokoll der in vitro Transkription:

	a.S.	S.
DNA-Probe	1,0µg	1,0µg
Sondenkonzentration	0,29µg/µl	0,25µg/µl
Sondenvolumen	4,0µl	4,0µl
10x Transkriptionspuffer	2,0µl	2,0µl
Dithiothreitol (Sigma)	2,0µl	2,0µl
RNA-Polymerase	2,0µl T3	2,0µl T7
NTP-Labeling-Mix (freie digoxigenin-markierte RNA-Nukleotide)	2,0µl	2,0µl
RNase-Inhibitor (Roche)	0,5µl	0,5µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 20µl	Auffüllen auf 20µl
Dithiothreitol: leitet sich vom Zuckeralkohol Threitol ab, gehört zu den Threosen, konserviert Proteine des Zellinnern in ihrer funktionalen Form (=Antioxidanz)		

Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### 2.1.8.2 Protokoll für die RNA-Präzipitation:

Transkriptionsmix	20,0µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	80,0µl
Glycogen	1,0µl
10M Ammoniumacetat	35,0µl
100% Ethanol (-20°C)	250,0µl
Ammoniumacetat: für Pufferlösungen zur Stabilisierung des pH, zur DNA-Fällung; Vorteil: keine Oligonukleotide und keine freien dNTPs werden mitgefällt	
Glykogen: tierische Stärke oder Leberstärke, Polysaccharid, speichert Energie in Form von Glucose	

Das zugefügte Ethanol wurde stets bei -20°C vorgekühlt und das Präzipitationsmix so lange auf Trockeneis inkubiert, bis die Lösung vollständig gefroren war. Die gefrorene Lösung konnte danach bei 14000 Umdrehungen und 4°C 10min lang zentrifugiert werden (Zentrifuge 5415R, Eppendorf). Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500µl 70%igen DEPC-Ethanol gewaschen und durch vortexen gemischt. Daran schloss sich noch einmal ein 10minütiger Zentrifugationsschritt bei 14000 Umdrehungen und 4°C an. Der Über-

stand wurde erneut verworfen und das Pellet schließlich in 100µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

### 2.1.9 Photometrische Konzentrationsmessung

---

*Mit der photometrischen Messung ist es möglich, Konzentrationen von Lösungen zu messen. Im Falle der DNA-Konzentrationsmessung handelt es sich um eine Transmissionsmessung im Absorptionsbereich von 260-280nm. Durch Prismen oder Filter wird monochromatisches Licht erzeugt. Der Transmissionsgrad dieses Lichtes wird von der Konzentration des absorbierenden Stoffes und der zu durchquerenden Strecke beeinflusst, woraus sich schließlich die Extinktion und somit die Konzentration der Lösung errechnen lässt. Um für die Messung einen neutralen pH-Wert zu erreichen, wird die DNA entweder mit einem Niedrig-Salz-Puffer wie TrisCl (pH 7,0) oder in H<sub>2</sub>O verdünnt.*

---

Die Konzentration wurde mit einem Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt. Zuerst wurde 20min nach Anschalten des Gerätes ein Leerwert ermittelt und dann die DNA für die Messung 1:100 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Zwischen den Messungen wurde die 1cm breite Küvette stets mit Wasser gespült.

### 2.1.10 Konstrukt für die Überexpression von *Flightless I*

---

*Plasmide sind kleine ringförmige DNA-Moleküle, die in Bakterienzellen vorkommen. Sie liegen extrachromosomal und verfügen über die Fähigkeit, sich autonom zu replizieren. Dieser Sachverhalt und die Tatsache, dass Plasmide neben einem Replikationsursprung (Ori) auch Gene enthalten, die sie zur Antibiotikaresistenz befähigen, machen sie sehr brauchbar für molekularbiologisches Arbeiten. Sie dienen als Vektoren, um ein oder aber auch mehrere Gene in einen Fremdorganismus einzuschleusen. Das gewünschte Gen („full length“ oder wichtige Einzelteile) kann mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen in die „Multiple Cloning Site“ (MCS) des Plasmids eingebaut und so zur Expression gebracht werden. Für die spätere Sichtbarmachung wird noch ein sogenanntes Reportergen angehängt.*

---

Bei den verwendeten Plasmiden handelte es sich um sogenannte „bi-cistron-Konstrukte“. Ein Cistron ist ein nicht weiter unterteilbares DNA-Segment, das zu einem Gen äquivalent ist. Es wird als einzelne funktionale Einheit gesehen, in der sich Mutationen nicht kompensieren lassen. Das erste Cistron war im vorliegenden Fall das grün fluoreszierende Markerprotein EGFP und das zweite ein Gen für die Überexpression von *Flightless-I*. Beide Cistronen sind voneinander unabhängig, aber dennoch in einem einzigen Vektor vereint, und so ließ sich durch

Ermittlung des Markergens die funktionelle Integrität des transfizierten Plasmids überprüfen.

Für das Konstrukt wurde die komplette Gensequenz („full length“) von *Gallus gallus Flightless-I* verwendet. Abbildung 2.1 zeigt das vollständige Plasmid von *Flightless-I*.

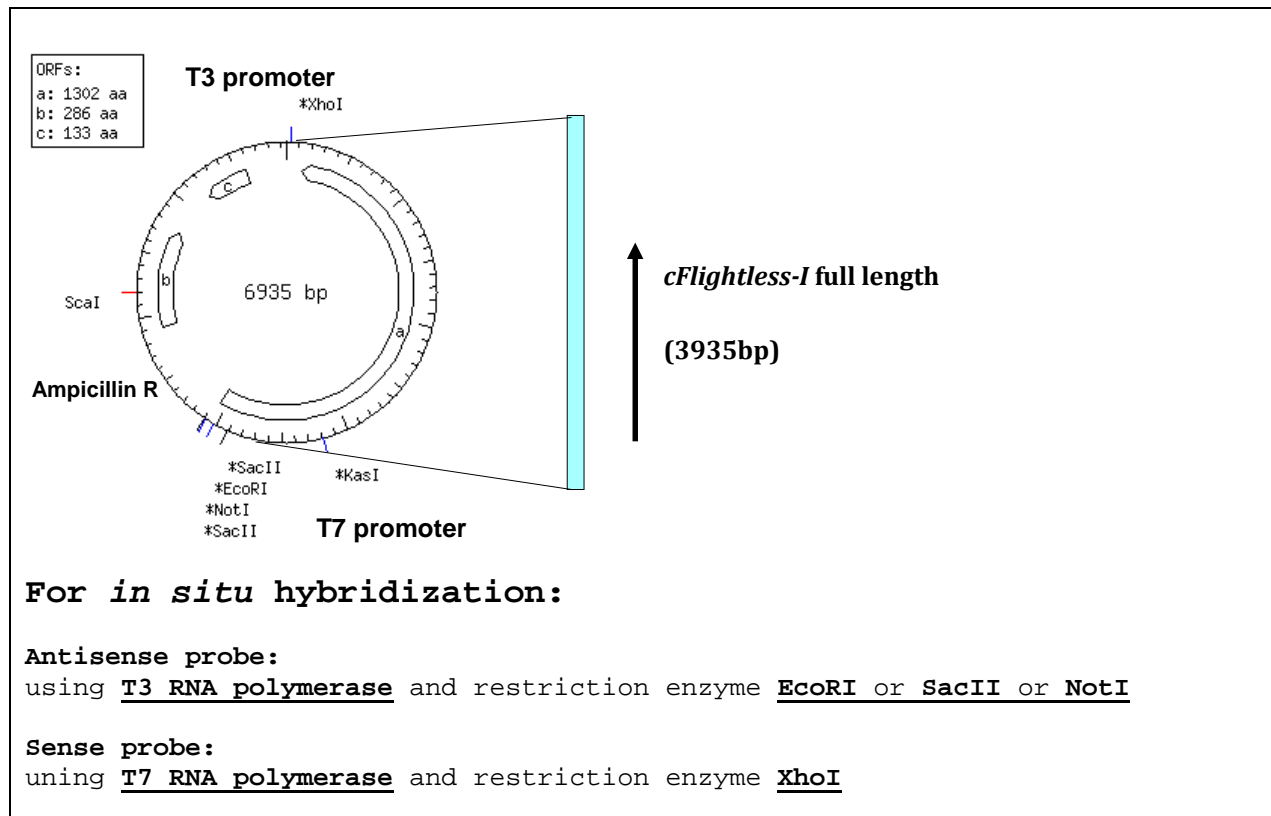


Abb. 2.1 pKS-cFlightless-I

Die Expression von *Fli-I* wurde unter der Kontrolle des  $\beta$ -actin-Promotors durchgeführt. Dieser lieferte bereits in vorangegangenen Versuchen hervorragende Ergebnisse in somitischen Zelllinien (Scaal et al., 2004). Zur Auswahl positiver Klone wurde Ampicillin verwendet.

Als Basis für das EGFP-Co-Expressions-Plasmid diente ein Vektor mit  $\beta$ -actin-Promotor-Element. So enthielt das Plasmid sowohl einen  $\beta$ -actin-Promotor als auch EGFP (Abb. 2.2).

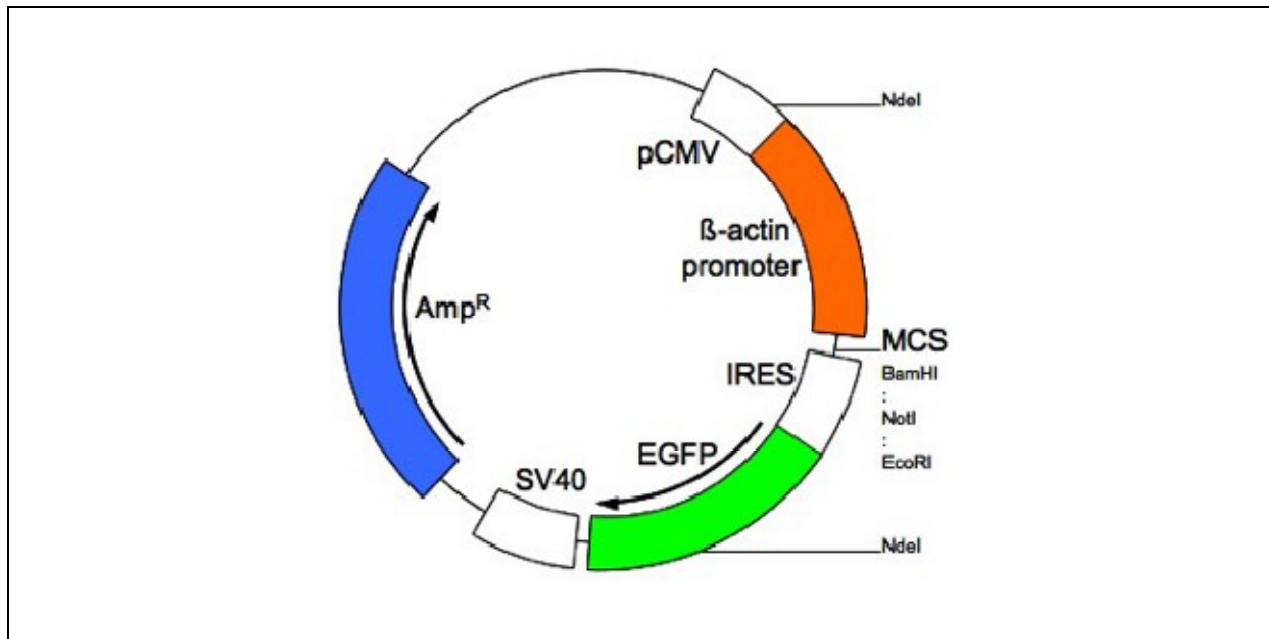


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Hauptelemente des Expressionsvektors mit  $\beta$ -actin-Promotor:  $\beta$ -actin-Promotor in orange, EGFP in grün und Ampicillinresistenzgen in blau. Die Größe liegt bei 5,8kb. Nur die für das Experiment verwendeten Restriktionsenzyme sind mit ihrer ungefähren Lage dargestellt. Der  $\beta$ -actin-Promotor sorgt für besonders gute Genexpression im mesodermalen Gewebe.

Verwendete Vektoren	
pcms-EGFP-Expressions-Vektor	Clontech
p $\beta$ -actin-promotor-Plasmid	aus eigenem Labor (Prof. Dr. Brand-Saberi, Freiburg)
pKS- <i>cFlightless-I</i> (0,64 $\mu$ g/ $\mu$ l)	GSF München (Prof.Dr.Jean-Marie Buerstedde/Randolph Caldwell)
pDrive-Cloning-Vektor (empty-Plasmid, Blue Clone)	Qiagen

### 2.1.11 Enzymatische Verdauung der DNA

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die in der Lage sind, spezifische DNA-Basensequenzen zu erkennen und zu schneiden. In der Molekularbiologie werden sie zum Aufschneiden ringförmiger DNA-Vektoren benutzt. So kann später eine Insertion gewünschter DNA-Fragmente erfolgen. Desweiteren dienen diese Restriktionsenzyme dazu, DNA-Fragmente für die Ligation vorzubereiten, und ermöglichen ohne Sequenzierung eine schnelle Analyse von DNA-Fragmenten.

Typ-II-Restriktionsendonukleasen binden spezifisch an bestimmte Erkennungssequenzen mit palindromer Struktur. Sie schneiden den Doppelstrang entweder direkt innerhalb der Erkennungssequenz oder in unmittelbarer Nähe. Die Schnittpunkte sind versetzt, es entstehen

sogenannte „sticky ends“, oder gerade Schnittenden, dann spricht man von „blunt ends“. Falls die Sequenz bekannt ist, ist es möglich, auf diese Weise DNA-Fragmente vorhersagbarer Größe zu erhalten.

Die für die Versuche verwendeten Enzyme sind von den Firmen Roche und NEB bezogen worden. Puffer und Temperatur (Reaktionsbedingungen) wurden für jedes Enzym nach Anleitung ausgewählt. Anschließend wurden die Reaktionsgemische nach Empfehlung des Herstellers zwischen 1 Stunde bis über Nacht inkubiert und die DNA-Fragmente mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese analysiert.

Für die Experimente war es nötig, sowohl die analytische als auch die präparative Restriktion zu nutzen.

#### 2.1.11.1 Analytische Restriktion

Bei der analytischen Restriktion handelt es sich um eine Überprüfung, ob die aus Plasmid oder PCR-Produkt erhaltenen DNA-Moleküle mit bereits bekannter Sequenz korrekt sind.

Die erhaltenen Banden werden unter UV-Licht mit den theoretisch zu erwartenden Bandenmustern verglichen. Die Notwendigkeit einer anschließenden Gelextraktion besteht nicht.

Folgendes Grund-Protokoll wurde für die analytische Restriktion verwendet und je nach Erfordernissen gegebenenfalls modifiziert:

DNA	1,0-6,0µg
100x BSA (NEB; 10mg/ml)	0,2-0,3µl
10x Reaktionspuffer	2,0-3,0µl
Restriktionsenzym	1,0-2,0µl
dd H <sub>2</sub> O	auffüllen auf 20µl

#### 2.1.11.2 Präparative Restriktion

In der präparativen Restriktion werden größere DNA-Mengen eingesetzt, die dann für weitere Experimente zur Verfügung stehen sollen. Deshalb ist es von größter Wichtigkeit, eine Kontamination mit Fremd-DNA zu vermeiden. Durch die Kombination zweier verschiedener Restriktionsenzyme ist es möglich, unterschiedliche „sticky ends“ zu erhalten, die anschließend zur Klonierung verwendet werden können.

Hierbei ist es notwendig, im Anschluss eine Gelextraktion durchzuführen, um die DNA-Moleküle für das weitere Vorgehen zu isolieren und aufzureinigen.

Folgendes Grund-Protokoll wurde für die präparative Restriktion verwendet und je nach Erfordernissen gegebenenfalls modifiziert:

DNA	3,0-4,0µg
100x BSA	0,2µl
10x Reaktionspuffer	2,0µl
Restriktionsenzym	1,0-1,8µl
dd H <sub>2</sub> O	auffüllen auf 20µl

Enzyme	
XhoI, NdeI	NEB
XhoI, ECORI, BAMHI	Roche

### 2.1.12 DNA-Agarose-Gel-Elektrophorese

*Die Gel-Elektrophorese dient der Auftrennung oder Reinigung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Länge. Geladene Moleküle bewegen sich im elektrischen Feld. Die DNA als negatives Teilchen wandert so von der Kathode zur positiv geladenen Anode.*

*Bei Agarose handelt es sich um ein Polysaccharid, das aus Seegrass isoliert wurde. Die Porengröße des Agarose-Gels bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit. Kleine DNA-Teile wandern schneller als große.*

*Zur Visualisierung wird Ethidiumbromid verwendet. Dieser, auch als Homidium bezeichnete, rote Phenanthridin-Farbstoff (ursprünglich zur Bekämpfung von Trypanosoma congolense bei Rindern), interkaliert mit Basenpaaren von DNA und RNA. Nach Anregung mit UV-Licht kommt es zur Fluoreszenzemission und die Nukleinsäuren im Gel leuchten hell auf.*

1%iges Agarosegel eignet sich für Fragmente in der Größenordnung zwischen 500bp und 10kb.

Für die Herstellung des Gels wurden 1,2g Agarose (Sigma) mit 120ml 1x TAE-Puffer so lange in einer Mikrowelle erhitzt, bis alle Agarose vollständig gelöst war. Anschließend musste das flüssige Gelgemisch auf ca. 60°C abgekühlt werden.

In eine Gelkammer (Pqqlab) wurden 6µl Ethidiumbromid (10mg/ml bei 4°C gelagert, Sigma) gegeben und anschließend das Gel darauf gegossen. Zur vollständigen Durchmischung wurde das Gemisch vorsichtig mit einer sterilen Pipettenspitze umgerührt und vorhandene Luftblasen vorsichtig entfernt.

Das Gel musste zur Aushärtung 30min ruhen. Danach wurden die Kammeinlagen, die im Gel kleine Vertiefungen schaffen, herausgezogen. In diese Vertiefungen werden später die Proben eingebracht. Das festgewordene Gel wurde vollständig mit 1x TAE-Puffer bedeckt.

Alle DNA-Proben und DNA-Markermoleküle (auch Ladder oder Gelpilot genannt) wurden mit 5µl 6x Gel Loading Dye Blue (New England Biolabs) vermischt und in die Vertiefungen des Gels eingebracht.

Rechts und links von den DNA-Proben wurden DNA-Marker-Moleküle ins Gel eingebracht. Dies sind DNA-Fragmente bekannter Größe (1kb und 100bp DNA ladders, 500µg/ml, NEB). Die ersten 5min wurden die Gele bei 70V, 52mA und 3 Watt gefahren, um den Proben das Eindringen ins Gel zu ermöglichen. Danach konnte auf 90-100V, 69mA und 5 Watt erhöht werden. Die Laufzeit betrug zwischen 1-1,5 Stunden (Powerpac 200, BioRad).

Unter UV-Licht (Vilber Lourmat) wurde die Bandengröße durch Vergleich mit den Marker-Molekülen bestimmt.

Zur Dokumentation wurden Bilder erstellt (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH).

DNA-Marker (Ladder)/ DNA-Probe	
3µl	DNA-Ladder (1kb oder 100bp, 500µg/ml, NEB)/ DNA-Probe
5µl	6x Gel Loading Dye Blue (New England Biolabs)
7µl	ddH <sub>2</sub> O

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE 50x)	
242,0g	Tris-Base (Sigma)
57,1ml	Eisessig (Riedel-deHaën)
100,0ml	0,5M EDTA pH 8,0 (Promega)
Alle drei Bestandteile wurden vermischt und anschließend mit DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 1 Liter aufgefüllt.	
TRIS: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, gute Puffersubstanz zw. pH 7,2-9,0, für in vitro Experimente sehr geeignet, da keine inhibierende Wirkung auf viele Enzyme besteht	
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure, Komplexbildner	

1x TAE-Puffer	
20,0ml	50x TAE-Puffer
Mit dm-H <sub>2</sub> O auf 1000ml auffüllen.	
dm-H <sub>2</sub> O: demineralisiertes H <sub>2</sub> O	

## 2.2. Gelextraktion der DNA-Fragmente

---

*Um mit den Versuchen fortfahren zu können, ist es nötig, die DNA-Fragmente vom Agarose-Gel zu säubern.*

---

Zuerst wurden die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell präzise aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten.

Die DNA-Isolierung wurde mit QIA quick® Gel Extraktion Kit (Qiagen) durchgeführt, wobei die Gelstücke bei 50°C im Thermocycler (Biometra®) geschmolzen und mit 30-50µl Elution-Puffer(Qiagen) aufgereinigt wurden.

### 2.2.1 Ligation von DNA-Fragmenten

---

*Um einen vollständigen Vektor zu erhalten, müssen die einzelnen DNA-Fragmente wieder zu einem geschlossenen Ring (Plasmid) zusammengefügt werden. Dies geschieht mit Hilfe von DNA-Ligasen.*

*DNA-Ligasen sind Enzyme, die in der Lage sind, durch eine Esterbindung zwischen dem Zucker der Desoxyribose und dem Phosphatrest zwei DNA-Moleküle mit einander zu verbinden.*

*Die T<sub>4</sub>DNA-Ligase, benannt nach Bakteriophage T4, kann sowohl „sticky ends“ als auch „blunt ends“ unter ATP-Verbrauch verknüpfen. Eine Ligation kann nur nach erfolgreicher Basenpaarung der Enden stattfinden. Da die Enden nur mit ihren komplementären Gegenstücken hybridisieren ist die Ligation stets unidirektional.*

---

Nachdem die DNA-Mengen durch Gelelektrophorese verglichen worden waren, wurden Vektor-DNA und Insert-DNA nach folgender Formel gemischt.

Berechnung der Insert-Menge: In Relation zu einer fixen Menge von 50ng Vektor

$$\frac{50\text{ng} \times \text{kb (insert)} \times 3\text{ratio}}{\text{kb (vector)}}$$

Für die Ligation wurden T<sub>4</sub>DNA-Ligase und Ligationspuffer von Promega verwendet.

Die Inkubation der Ligationsansätze erfolgte bei 22°C für 3h oder über Nacht bei 8°C.



### 2.2.1.1 Grund-Protokoll für die Ligation:

Vektor	50,0ng (1µl)
Insert	Berechnet (meist 1µl)
10x Ligase-Puffer	1,0µl
T <sub>4</sub> DNA-Ligase	1,0µl
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 10,0µl

## 2.3. Entwicklungsbiologische Methoden

### 2.3.1 Hühnerembryonen

Von der örtlichen Geflügelfarm Bronner in Freiburg-Tiengen wurden befruchtete Hühnereier der Rasse „Weiße Leghorn“ (*Gallus gallus*) bezogen. Bei 14°C Lagerungstemperatur konnten die Eier vor der weiteren Verwendung bis zu 3 Tage lang aufbewahrt werden. Das Bebrüten der Eier erfolgte in einem speziellen Inkubator für Geflügeleier (Ehret). Die Temperatur betrug 37-38°C bei einer relativen Luftfeuchte von 60-85%. Das Entwicklungsstadium der Embryonen wurde nach Hamburger und Hamilton (1951) bestimmt. Hauptkriterium für die Einteilung ist dabei die Anzahl der bereits gebildeten Somiten. Für die Versuche war eine Bebrütungsdauer von 2,5 Tagen erforderlich.

### 2.3.2 Elektroporation im Hühnerei

---

*Bei der Elektroporation handelt es sich um ein Verfahren, das Zellmembranen permeabel macht. Mit Hilfe eines Kondensators wird ein elektrisches Feld erzeugt, welches für ein paar Millisekunden die Zellmembran öffnet und so das Eindringen von Fremd-DNA ermöglicht. Bei dieser Methode ist die Transformationsrate sehr hoch.*

*Die Elektroporation in ovo bietet mehrere Vorteile: Der Embryo kann in seiner natürlichen Umgebung weiterleben und das Ei als abgeschlossene Einheit ermöglicht ein relativ steriles Arbeiten. Alle Vorgänge der Elektroporation können im Ei erledigt werden. Dies bedeutet zum einen, dass die Experimente in vivo durchgeführt werden können und zum anderen reduziert es deutlich die Risiken versuchsschädigender, äußerer Umwelteinflüsse wie Temperaturabfall, Kontamination, Austrocknung und Energieunterversorgung. Durch die Minimierung von Entwicklungsstress wird so eine hohe Überlebensrate erzielt. Darüber hinaus kann jedes einzelne Ei als eigenständiges Experiment angesehen werden und es besteht keine Notwendigkeit das Muttertier zu töten, um an die Embryonen zu gelangen.*

*Die Elektroporation an sich wird beeinflusst von Faktoren wie: Elektroden, Abstand der Elektroden zum Zielbereich, Entwicklungsstadium und Zielregion.*

---

Für die Überexpressionsversuche von *Flightless-I* lag das DNA-Plasmid in Lösung vor. Die Konzentration betrug 10,558µg/µl. Für eine bessere Durchdringung und ein langsames Herausdiffundieren nach Injektion wurde der Plasmid-Lösung der Farbstoff „fast green“ (Sigma) zugesetzt. Die Injektion erfolgte mit Hilfe einer Borosilikat-Glas-Kapillare mit einem Innendurchmesser von 1,1mm (Sutter instruments). Um während der Operation möglichst wenig Gewebe zu zerstören, wurde die Spitze der Kapillare durch Erhitzen und mit Hilfe eines speziellen Geräts hauchdünn ausgezogen (Modell P-97, Sutter instruments). Zum Arbeiten wurde anschließend die Spitze der Kapillare mit einer Schere entfernt und die nun offene Mikrokapillare auf einen Saugschlauch mit Mundstück aufgesetzt (Sigma Aldrich) und das Plasmid aufgesogen.

Als Elektroden fanden ein 2cm langer Platindraht ((+)-geladen = Anode, rot gekennzeichnet) mit 0,3mm Durchmesser und ein 2cm langer Wolframdraht ((-)-geladen = Kathode, schwarz gekennzeichnet) mit ebenfalls 0,3mm Durchmesser Verwendung. Diese Elektroden wurden in eine selbst hergestellte Plastikhalterung gesteckt. Im Innern der Plastikhalterung verliefen die Kabel, die die Verbindung zum Elektroporationsgerät (Elektroporator, TSS 20 OVODYNE, Intracel) ermöglichten. Bei der Elektroporation muss stets darauf geachtet werden, dass Zellen und Elektroden in einer Linie liegen. Um eine unerwünschte, ungerichtete Verteilung des elektrischen Feldes zu verhindern, wurden die Drahtelektroden auf der dem Embryo abgewandten Seite mit schnelltrocknendem Nagellack ummantelt (60s Nagellack von Rimmel). Von Zeit zu Zeit empfahl es sich, die Elektroden in doppelt destilliertem Wasser von Verklebungen zu reinigen.

Für die Operation wurden alle Instrumente sterilisiert und sowohl die Eier als auch die Umgebung (Tisch, Arbeitsfeld am Mikroskop) mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Nachdem das Ei in horizontaler Lage geschiert und die Lage des Embryos mit Bleistift auf der Schale des Eis markiert worden war, wurde es für eine stabile Lagerung in ein Nest aus mit Alufolie umhüllter und mit einem Tupfer ausgepolsterten Petrischale verbracht. Am stumpfen Pol wurde mit einer Schere ein Loch in die Eischale und äußere Schalenmembran gestoßen. Mit einer Spritze und aufgesetzter Nadel (ø 0,80 x 40mm, grün, Sterican®, Braun) wurden durch das Loch 2,5ml Albumin abgesaugt und so auch die innere Schalenmembran eröffnet. Durch diesen Vorgang sinkt der Embryo nach unten ab und bleibt beim Eröffnen des Eis nicht an der Kalkschale kleben. Auf die mit Bleistift markierte Stelle wurde Klebeband geklebt und anschließend mit Hilfe einer Schere ein ovales Loch von ca. 2cm Länge in das Ei geschnitten. Um besser arbeiten zu können, wurde der Embryo durch Auffüllen mit penicillinhaltiger LOCKE-Lösung wieder näher an die Oberfläche der Schale verbracht (3ml Plastik-Einmalpipette von Falkon®, Becton Dickinson Labware).

Um den Kontrast zwischen Embryo und Eigelb zu erhöhen, wurde schwarze Tusche (Zeichentusche von Rotring), 1:10 mit LOCKE-Lösung verdünnt, in das Eigelb unter das Blastoderm gespritzt ( $\varnothing$  0,40 x 20mm, schwarz, Sterican®, Braun).

Die weitere Arbeit erfolgte ab hier unter einem Seziermikroskop von Leica. Als erstes wurde die Vitellinmembran mit einer Pinzette (55 oder 5 INOX, FST by Dumont) oder einem selbstgemachten zugespitzten, dünnen Draht geöffnet und der zu injizierende Bereich freigelegt (Abb. 2.3.1-2.3.2). Das Plasmid (10,558 $\mu$ g/ $\mu$ l) wurde für eine bessere Sichtbarkeit mit Fast Green Pulver (Sigma) vermischt und in die Kapillare eingesaugt. Dann wurde die Mikrokapillare im präsomalen Mesoderm, nahe dem letzten Somiten, eingestochen und langsam von caudal nach cranial durch die Somiten geschoben (Abb. 2.3.3). Beim Zurückziehen der Kapillare wurde die DNA mit Hilfe des Saugschlauches herausgepustet, wobei es sich empfahl, in der Mitte jedes Somiten eine kurze Pause zu machen, bis dieser sich sichtbar gefüllt hatte (Abb. 2.3.4-2.3.5). Zuletzt wurde noch einmal LOCKE-Lösung auf den Embryo gegeben, damit die Elektroden beim Eintauchen vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sind. Eine Elektrode befand sich rechts und die andere links, leicht unterhalb des Embryos in einer Linie (Abb. 2.3.6). Auf diese Weise war es möglich, in die dorsomediale Lippe des Dermomyotoms zu elektroporieren. Die DNA wanderte stets von der negativ geladenen (schwarz markiert) Elektrode zur positiven (rot markiert). Gearbeitet wurde bei 60V mit 5 Pulsen von 20ms Dauer und einem Intervall von 200ms. Die Stromstöße wurden über ein Fußpedal ausgelöst (Herga).

Am Ende wurden die operierten Eier jeweils mit einem Streifen Durapore™ Tape (3M Health Care) verschlossen und für 24-48h weiter inkubiert.

Abbildung 2.3.1-6 zeigt die Technik der Elektroporation in ovo:

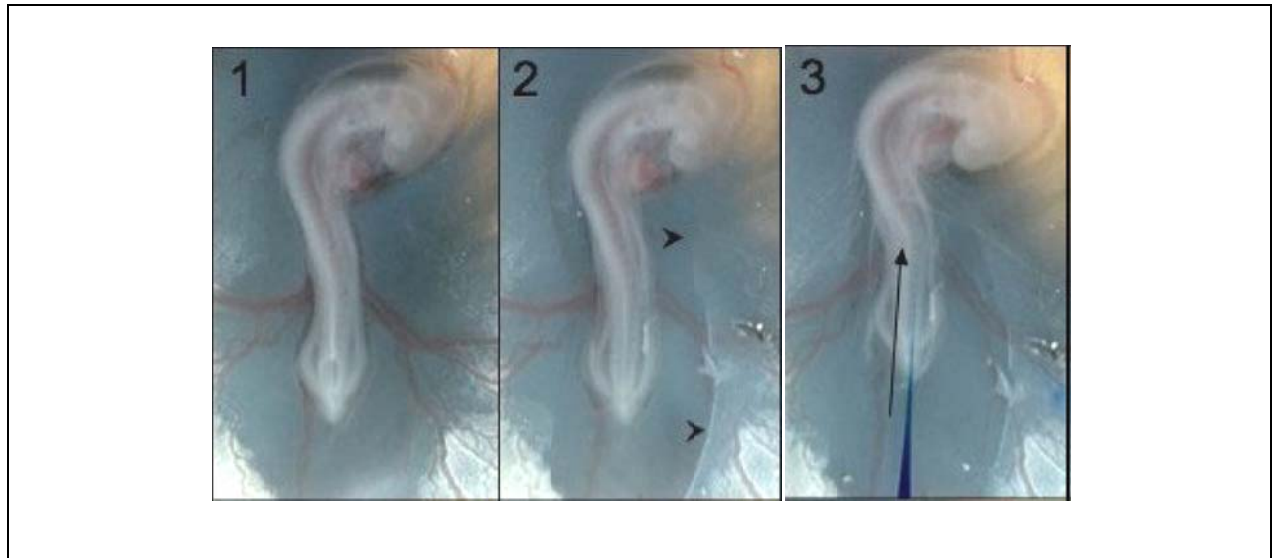


Abb. 2.3.1 Ein gesunder Embryo im Ei (Stadium HH18)

Abb. 2.3.2 Öffnung der Vitellinmembran (Pfeile deuten auf den Rand der geöffneten Vitellinmembran)

Abb. 2.3.3 Mikrokapillare wird in Pfeilrichtung in die Somiten eingeführt (blaue Struktur)

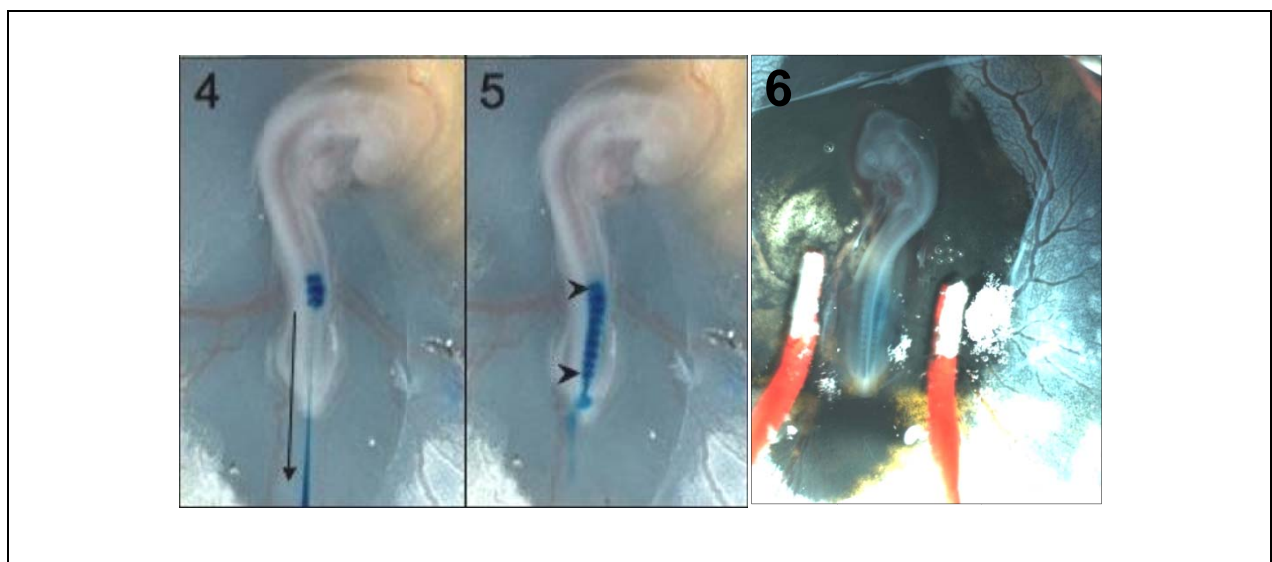


Abb. 2.3.4 Zurückziehen der Mikrokapillare und Injektion des Plasmids

Abb. 2.3.5 Neun Somiten enthalten jetzt das Plasmid

Abb. 2.3.6 Position der Elektroden. Die Kathode befindet sich rechts vom Embryo, wohingegen die Anode auf der linken Seite des Embryos zu liegen kommt.

Abb. 2.3 Veranschaulichung der Technik der Elektroporation in ovo (Rudloff, Diplomarbeit 2006)

LOCKE-Lösung	
94,270g	NaCl (Merck) in 1000ml ddH <sub>2</sub> O lösen
12,0255g	KCl (Merck) in 1000ml ddH <sub>2</sub> O lösen
15,8092g	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Roth) in 1000ml ddH <sub>2</sub> O lösen
100ml der NaCl-Stammlösung wurden mit ddH <sub>2</sub> O auf 1000ml aufgefüllt. Danach wurden 37ml von der KCl-Stammlösung und 21ml von der CaCl-Stammlösung hinzugefügt (gesamt:1058ml). Anschließend wurde die Lösung autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde PenicillinG (Sigma) zugesetzt. Die fertige Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.	

Antibiotika-Stamm-Lösung	
2,0g	Na-Ampicillin-Salz (Sigma)
Das Antibiotikum wurde in 20ml ddH <sub>2</sub> O gelöst und durch Filtration mit einem Filter sterilisiert. Die Porengröße des Filters betrug 0,22µm (Integra Biosciences). Die Stock-Lösung (100mg/ml) wurde bei -20°C aufbewahrt. Für das Arbeiten wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100µg/µl verwendet.	

### 2.3.3 Sichtbarmachung des Plasmids

*Die Kopplung des eingebrachten Plasmids mit einem fluoreszierenden Reportergen und der schnelle Zugang zum operierten Embryo machen eine Beobachtung in vivo möglich.*

*Grün fluoreszierendes Protein (GFP) wurde zuerst in der pazifischen Quallenart Aequorea victoria entdeckt und kann, mit blauem oder ultraviolettem Licht angeregt, grün fluoreszieren.*

*Auf diese Weise ist es möglich, sowohl die zeitliche als auch die räumliche Verteilung von Proteinen in lebenden Zellen sichtbar zu machen.*

*Heutzutage wird normalerweise modifiziertes GFP verwendet, welches stabiler ist und heller leuchtet. Dies ist das sogenannte enhanced GFP (EGFP). Das Anregungsmaximum liegt bei 488nm und die Emissionswellenlänge bei 507nm.*

Die Beobachtung der erfolgreichen Elektroporation wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (MZFLIII, Leica) durchgeführt. Zur Anregung wurde eine Quecksilberdampflampe (HBO® 103W/2, Osram) benutzt. Das EGFP konnte mit zwei Filtern (GFP1/GFP2) nachgewiesen werden. Tote und missgebildete Embryonen wurden nicht verwendet, wohingegen leicht verkrümmte noch für die Analyse brauchbar waren. Mit einer Digitalkamera (DC 300 F, Leica) wurden die Embryonen entweder direkt im Ei oder nach Fixation außerhalb des Eis in einer Petrischale fotografiert. Die Embryonen, die aufgrund ihrer Lage nicht im Ei fotografiert werden konnten, mussten in LOCKE-Lösung fixiert und dann in ein Fotoschälchen verbracht werden. Das Fotoschälchen bestand aus einer Petrischale, die mit etwas Agarosegel gefüllt und mit LOCKE-Lösung, PBS oder PBT überschichtet war. Um den Embryo für das Fotografieren in eine geeignete Position zu bringen, wurde mit einer Pinzette ein Loch in das

Agarosegel gemacht und der Embryo hineingelegt. Die Bilder entstanden mit Hilfe verschiedener Vergrößerungen (2,5-fach, 5-fach, 8-fach, 10-fach).

Agar 2%	
1,2g	Agarose (Sigma)
Der Agar wurde in 60ml ddH <sub>2</sub> O gelöst.	

Agar 4%	
6,0g	Agarose (Sigma)
Der Agar wurde mit ddH <sub>2</sub> O auf 150ml aufgefüllt und durch Kochen in einer Mikrowelle gelöst.	

### 2.3.4 In-situ-Hybridisierung nach Patel

*Die In-situ-Hybridisierung ist ein Verfahren, bei dem ein markierter komplementärer DNA- oder RNA-Strang dazu benutzt wird, spezifische mRNA in Gewebestücken oder vollständigen Embryonen (Whole mount) nachzuweisen. Der komplementäre Nukleinsäure-Strang wird künstlich hergestellt und als Sonde bezeichnet. Die Markierung der Sonde erfolgt durch Haptene, wie zum Beispiel Digoxigenin.*

*Auf diese Weise ist es möglich, eine Momentaufnahme der zu untersuchenden mRNA im jeweiligen Gewebe zum Zeitpunkt der Fixation zu erhalten.*

*Meist findet Digoxigenin-markierte RNA Verwendung. Das Digoxigenin kann mit Hilfe eines enzymgekoppelten Antikörpers (anti-Digoxigenin-Antikörper) erkannt und in einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Es handelt sich also um eine Immuno-enzymatische Reaktion. Als Reporter-Enzym findet die Alkalische Phosphatase Verwendung, deren Substrate, 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT), zu einem blauen Indigo-Farbstoff umgesetzt werden.*

#### 2.3.4.1 Fixierung und Aufbewahrung

*Der erste Schritt für die In-situ-Hybridisierung (ISH) ist die Konservierung der Embryonen. Dieser Schritt ist zwingend notwendig, um Zellstrukturen zu erhalten und das Gewebe widerstandsfähig zu machen, um Kontamination mit Bakterien und Pilzen zu verhindern, und nicht zuletzt um der Autodigestion entgegenzuwirken.*

*Zur Haltbarmachung eignen sich vor allem Aldehyde wie das Formaldehyd. Aldehyde sind in der Lage, Iminbindungen einzugehen und auf diese Weise Quervernetzungen zu bilden. Die Bindung erfolgt hauptsächlich zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff des Aldehyds und der NH<sub>2</sub>-Gruppe auf zellulärer Seite. Die Anzahl der Querverbindungen verhält sich proportional zur Fixationszeit.*

Der Embryo wurde vorsichtig aus dem Ei herausgeholt und in eine mit penicillinhaltiger LOCKE-Lösung gefüllte Petrischale verbracht. Unter dem Mikroskop war es nun möglich, mit Hilfe einer Iridektomieschere und einer Pinzette, den Embryo von den Eihäuten zu befreien. Danach wurde der Embryo für die Fixation sofort in eine paraformaldehydhaltige Lösung verbracht und auf Eis gelagert. Dabei wurde bis einschließlich Stadium HH24 in 4% Paraformaldehyd (Merck) in DEPC-PBS fixiert und ab Stadium HH25 in 4% Paraformaldehyd in DEPC-PBT. Die Lagerung erfolgte bei 4°C über Nacht. Wenn die Embryonen nicht gleich für die ISH vorgesehen waren, wurden sie zur Langzeitaufbewahrung in Methanol verbracht. Methanol dehydriert, koaguliert und präzipitiert Proteine sowie Nukleinsäuren und Kohlenwasserstoffe. Diese Fixierung ermöglicht eine Aufbewahrung von bis zu einem Jahr.

Waschschritte der verwendeten Methanolreihe:

- 1.) Herstellung von 1x PBT in DEPC-Wasser  
5ml 10x PBT + 45ml DEPC-Wasser
- 2.) 2 x 10min in 1x PBT
- 3.) 2 x 10min in 50%iges Methanol  
25ml 1x PBT + 25ml 100%iges Methanol (Fluka)
- 4.) 1 x 10min in 100%iges Methanol
- 5.) 100%iges Methanol erneuern
- 6.) Einfrieren bei -20°C

Es war stets darauf zu achten, dass RNase-frei gearbeitet wurde.

Phosphatgepufferte-Salzlösung (10x PBS)	
80,0g	NaCl (Merck)
2,0g	KCl (Merck)
14,4g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)
2,4g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma)
Die Bestandteile wurden in 800ml DEPC-Wasser verdünnt und durch Zugabe von 3-4ml 1N NaCl oder 1N HCl wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde dann auf ein Endvolumen von 1l aufgefüllt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.	

20x PBS pH7,4	
160g	NaCl (Merck)
4,0g	KCl (Merck)
28,8g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)
4,8g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma)
Die Bestandteile wurden mit DEPC-H <sub>2</sub> O auf 1,0l aufgefüllt.	

Phosphatgepufferte-Salzlösung mit 0,1% Tween-20 (PBT)	
10,0ml	10% Tween-20 (Sigma)
Das Detergenz wurde mit 1x PBS verdünnt und die Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt.	

10x PBT	
80g	NaCl (Merck)
2g	KCl (Merck)
2,4g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
14,4g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Die Bestandteile wurden gemischt und mit DEPC-H <sub>2</sub> O auf 800ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine gründliche Durchmischung auf dem Magnetrührer und ein pH von 7,4 wurde eingestellt. Danach wurden der Lösung 10ml Triton (bei 37°C vorgewärmt) zugesetzt. Die entstandene Lösung wurde schließlich mit DEPC-H <sub>2</sub> O auf ein Endvolumen von einem Liter aufgefüllt.	

4% Paraformaldehyd in PBT (4%Pfa)	
2,0g	Paraformaldehydpuder (extra pure, Merck)
Das Pulver wurde mit 25ml PBT vermischt und in einem 65°C warmen Wasserbad erhitzt. Danach konnte mit PBT auf ein Endvolumen von 50ml aufgefüllt und die Lösung bei -20°C aufbewahrt werden.	
Paraformaldehyd: Polymer von Formaldehyd, konservierend, keimabtötend. Am Ende entsteht immer ein Radikal, das sich nach und nach absplattet. Auf diese Weise durchdringt das Pfa das Gewebe schonender.	



### 2.3.4.2 Hybridisierung und Stayning des Embryos

*Digoxigenin-markierte RNA-Probe, auch Riboprobe genannt, die zur mRNA des gesuchten Gens komplementär ist, wird mit dem Embryo zusammengebracht. Nach erfolgreicher Bindung der Probe an die mRNA wird die spezifische Lokalisation sichtbar gemacht. Das antigenbindende Fragment Fab des Antikörpers erkennt die Digoxigeninmarkierung an der Probe. An dieses Fab-Fragment sind Alkalische Phosphatasen kovalent gebunden. Diese vernetzen so die Detektion der hybridisierten Nukleinsäuremoleküle mit einer enzymatischen Farbreaktion.*

Alle Lösungen wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O an Stelle von ddH<sub>2</sub>O angesetzt und auf der Schüttelplattform (Titramax 101, Heidolph) geschwenkt. Die zu hybridisierenden Embryonen wurden in eine Zellkulturplatte (Falkon) mit 24 Fächern verbracht. Als erstes erfolgte eine Rehydrierung auf Eis bis zu PBT.

75%iges Methanol	10-20min	37,5ml Methanol+12,5ml DEPC-H <sub>2</sub> O
50%iges Methanol	10-20min	25ml Methanol+25ml 1x PBS
25%iges Methanol	10-20min	12,5ml Methanol+37,5ml 1x PBT
1x PBT	10-20min	

Anschließend konnte pro Fach 1ml ProteinaseK in PBT zugegeben werden. Die Embryonen verblieben pro Stadium eine Minute in ProteinaseK (z.B. HH20 → 20min), wobei für HH14-18 10µg/ml ProteinaseK und für HH18-30 20µg/ml Verwendung fanden. Danach erfolgte ein 10-minütiges Waschen in PBT, gefolgt von der Fixierung in 1% Glutardialdehyd in 4% Pfa/PBT für 20min und erneutes Waschen für 10min in PBT. Bis hier wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Zur Prähybridisierung mussten die Embryonen im Prähybridisierungspuffer bei 65°C im Hybridisierungssofen (Thermo electron) inkubiert und der Puffer nach 2h gewechselt werden. Am nächsten Tag wurde in jedes Fach 1µl Digoxigenin markierte RNA-Probe zum Hybridisierungsmix hinzugegeben und für weitere 36-48h bei 65°C inkubiert. Anschließend folgten mehrere Waschschrte für jeweils 20min:

- 1 x bei 65°C in 2x SSC
- 2 x bei 65°C in 2x SSC mit 1% CHAPS(1:50)
- 2 x bei 65°C in 0,2x SSC mit 1% CHAPS(1:50)

Danach wurde die Lösung bei Raumtemperatur für 5min durch KTBT ersetzt und schließlich erfolgte für 4h das Präblocking mit 10%igem Lamm-Serum in KTBT. Die Embryonen wurden dann über Nacht bei 4°C mit dem anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche) inkubiert. Die Verdünnung des Antikörpers betrug 1:2000-1:4000 in 10%igem Lammserum in KTBT. Am nächsten Tag erfolgte ein mehrfaches Waschen mit KTBT (6x 2h bei RT und dann über Nacht

bei 4°C). Am letzten Tag der ISH wurden die Embryonen bei RT 2x für 15min in frischem AP-Puffer geschwenkt und schließlich ebenfalls bei RT mit folgender Färbelösung für 20min mehrere Stunden im Dunkeln inkubiert:

- 4,5µl NBT/ml und 3,5µl BCIP/ml in AP-Puffer

Bei manchen Proben musste die Färbelösung zwischendurch erneuert werden.

Zuletzt wurde mit AP-Puffer gewaschen, danach mit PBS und schließlich die fertigen Embryonen zur Aufbewahrung in 4%iges Pfa/PBS verbracht und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Falls die Färbung zu stark geworden war, konnte mit Diethylamin entfärbt werden.

#### 2.3.4.3 Protokoll für das Entfärben:

- 4%iges Pfa/PBS
- PBS
- Entfärbende Lösung: Dimethylformamid (Embryo wird blau)  
Methanol (Embryo wird blau u. transparent)  
Formamid EDTA Pfa oder PBT (am stärksten, Embryo wird blau u. glasig)
- PBS
- ddH<sub>2</sub>O
- 4% Pfa/PBS

Nach zu starkem Entfärben ist ebenfalls ein erneutes Färben möglich:

- 10min AP-Puffer
- Färbelösung
- Waschen in PBS
- 4%Pfa/PBS

ProteinaseK Aliquots	
20µg/µl = 20mg/ml	ProteinaseK Stammlösung (Roche)
Das Enzym wurde in DEPC-Wasser gelöst, gevortext und als 25µl Aliquots bei -20°C eingefroren. Für den Gebrauch wurde eine 1:1000 Verdünnung hergestellt, d.h. 1µl ProteinaseK musste in 1ml PBT gelöst werden, das entspricht 20µg/ml (daher wurde für einen ISH-Durchgang 20µl ProteinaseK in 20ml PBT gelöst).	

Glutardilaldehyd Aliquots	
25% Lösung	Glutardialdehyd (VWR)
Von der vorfixierten Lösung wurden 200µl Aliquots bei -20°C eingefroren.	

Standard Sodium Citrate (20x SSC) = Natriumcitrat	
173,5g	NaCl (Merck)
88,3g	Natriumcitrat (Sigma)
Die Bestandteile wurden in 800ml DEPC-Wasser gelöst und der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Zuletzt wurde die Lösung auf ein Endvolumen von einem Liter aufgefüllt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.	

10% CHAPS	
10% (w/v)	CHAPS (AppliChem)
Das Pulver wurde in PBT gelöst und die fertige Lösung bei 4°C aufbewahrt.	
CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1- Propansulfonsäure = nichtionische Seife	

Hybridisierungs-Puffer	
250,0ml	50% Formamid (VWR)
125,0ml	20x SSC
0,5ml	10% CHAPS
5,0ml	Triton X-100 (Sigma)
5,0ml	0,5M EDTA
25,0mg	Heparin (Sigma)
0,5g	tRNA (1mg/ml) gegen unspezifische, elektrostatische Bindungen
10,0g	Blocking-Reagenz (Roche)
Die Bestandteile wurden in 800ml ddH <sub>2</sub> O gelöst und für mehrere Stunden gerührt. Die Aufbewahrung der Lösung erfolgte bei Raumtemperatur.	
Formamid: Zur Stabilisierung bzw. Denaturierung von Nukleinsäuren	
CHAPS: Detergenz	
Triton X-100: = Octoxinol-9, Detergenz, löst Membranproteine in ihrem natürlichen Zustand aus Membranen heraus, ohne sie zu denaturieren, zur Permeabilisierung eukaryotischer Zellmembranen (z.B. AK-Färbung), Bestandteil des Lyse-Puffers bei der DNA-Extraktion	
Heparin: Gerinnungshemmer	

KTBT (Tris gepufferte Salzlösung, 10x)	
88,0g	NaCl (Merck)
15,0g	KCl (Merck)
100,0ml	Tween-20 (Sigma)
250,0ml	1M Tris pH 7,3
Alle Bestandteile wurden gemischt, mit DEPC-Wasser auf 1l Endvolumen aufgefüllt und bei RT aufbewahrt.	

Alkalischer Phosphatasepuffer (AP/NTMT, immer frisch ansetzen)	
5,0ml	1M Tris pH 9,5
2,5ml	1M MgCl <sub>2</sub>
1,0ml	5M NaCl
2,0ml	25% Triton X-100
Alle Bestandteile wurden gemischt und mit ddH <sub>2</sub> O auf ein Endvolumen von 50ml aufgefüllt.	

1M MgCl <sub>2</sub> Lösung	
203,3g	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O (Sigma)
Das Salz wurde in 800ml ddH <sub>2</sub> O gelöst, auf ein Endvolumen von 1l aufgefüllt und bei RT aufbewahrt.	

5M NaCl Lösung	
292,2g	NaCl (Merck)
Das Salz wurde in 800ml ddH <sub>2</sub> O gelöst, auf ein Endvolumen von 1l aufgefüllt und bei RT aufbewahrt.	

25% Triton X-100	
12,5g	Triton X-100
Das Detergenz wurde in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt, mit ddH <sub>2</sub> O auf ein Endvolumen von 50ml aufgefüllt und bei RT aufbewahrt.	
Triton: bindet Formamid besser	

Färbelösung	
4,5µl/ml	4-Nitro-blau-tetrazolium-chlorid (NBT, Roche)
3,5µl/ml	5-Bromo-4-chloro-3-indol-phosphat (BCIP, Roche)
NBT und BCIP wurden mit frisch zubereitetem AP-Puffer gemischt und im Dunkeln aufbewahrt. (NBT und BCIP zerfallen unter Lichteinwirkung)	

### 2.3.5 Dokumentation der Ergebnisse

---

*Die Veränderungen der Genexpression können durch das Verfahren der In-situ-Hybridisierung sichtbar gemacht werden. Die Hochregulierung eines Gens zeigt sich durch eine Verstärkung des Signals, also einer deutlich stärkeren Färbung, wohingegen es bei einer Herunterregulierung zu einer Abschwächung (schwächere Färbung) des Signals bis hin zum völligen Verlust kommt.*

---

Zur Dokumentation der Befunde wurden die Embryonen in eine mit Agarose und Flüssigkeit (LOCKE, PBT oder PBS) gefüllte Petrischale verbracht und unter einem Seziernmikroskop (MZFLIII, Leica) mit einer Digitalkamera (DC 300F, Leica) fotografiert. So konnte ein Seitenvergleich zwischen Effekt- und Kontrollseite vorgenommen werden. Um sicherzugehen, dass es sich bei dem Ergebnis nicht um einen Artefakt handelte, wurden die Effekte auch stets auf Übereinstimmung mit den Fluoreszenzbildern überprüft. Gespeichert wurde mit der IM 50 Software von Leica.

### 2.3.6 Vibratomschnitte

Die Embryonen wurden in 4%ige Agarose eingebettet. Nach Erkalten der Agarose wurden mit Hilfe einer Rasierklinge kleine Blöckchen mit den darin enthaltenen Embryonen herausgeschnitten. Diese Blöckchen konnten anschließend in der gewünschten Ausrichtung auf die Plattform des Vibratoms geklebt (Sekundenkleber, UHU) werden. Die Schale, die diese Plattform umgibt, wurde mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Auf diese Weise war es möglich, die 50µm dicken, flotierenden Schnitte mit einem Pinsel zu entnehmen und ohne Schädigung auf einen Objektträger zu verbringen. Die Schnitte entstanden bei einer Geschwindigkeit von 6,9 und einer Frequenz von 6-7.

### 2.3.7 Antikörperfärbung

#### 2.3.7.1 Protokoll für die Antikörperfärbung von Vibratomschnitten:

- 2x 10min\_in 1x PBS
- 30min\_in 1%BSA
- Über Nacht\_1.AK (GFP-anti-Kaninchen)
- 2x 10min\_in 1x PBS
- 90min\_2.AK (Cy2)

### 2.3.8 Floating-ISH

Bei der Floating-ISH wird eine ISH nach Patel an Vibratomschnitten durchgeführt. Die einzelnen Schritte entsprechen den Protokollschritten der Whole-mount-ISH.

#### 2.3.8.1 Paraffinschnitte

Nach dem Entfernen der embryonalen Hüllen wurden die Embryonen über Nacht in Serra fixiert.

Zusammensetzung von Serra:

- 60ml Ethanol, unvergällt
- 30ml Formaldehyd
- 10ml Eisessig (3ml Eisessig + 97ml 100% Ethanol)

Anschließend mussten die Embryonen in einer aufsteigenden Alkoholreihe für die Paraffineinbettung vorbereitet werden:

Die Zeiten der aufsteigenden Alkoholreihe sind abhängig von der Größe der Embryonen:

- 15min\_in 70% Alkohol (HH17-21: 20min; HH30: 30min)
- 15min\_in 80% Alkohol (HH17-21: 20min; HH30: 30min)
- 15min\_in 90% Alkohol (HH17-21: 20min; HH30: 30min)
- 2x 15min\_in 95% Alkohol (HH17-21: 20min; HH30: 30min)
- 2x 15min\_in 100% Alkohol (HH17-21: 20min; HH30: 30min)
- 2x 15min\_in Rotihistol = Xylol (Lösungsmittel) (HH17-21: 40min; HH30: über Nacht)
- 2h\_in Paraffin (HH17-21: 3-5h; HH30: über Nacht und 1x wechseln)
- Einbettung in Paraffin

Das Ethanol wurde jeweils mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt.

Die Paraffinblöcke wurden an einem Mikrotom von Reichert-Jung (Mod.1140/Autocut) bei einer Geschwindigkeit von 8 in 8µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden auf silanbeschichtete Objektträger oder auf Superfrost® Plus-Objektträger (Thermo Scientific) aufgezogen. Zuerst wurde auf die Objektträger ein großer Tropfen DEPC-H<sub>2</sub>O gegeben und die Schnitte zum Glätten daraufgelegt. Danach wurde die Flüssigkeit gründlich abgesaugt und die Schnitte auf einer Wärmeplatte (Medax) bei 42°C getrocknet.

### 2.3.8.2 Protokoll für die Silanbeschichtung:

#### 1.) Objektträger Spülen

- 1x 5min.\_ 20% HCl
- 70% Ethanol (unvergällt)
- (40ml HCl + 140ml Ethanol + 20ml DEPC-H<sub>2</sub>O)
- 2x kurz\_ 100% Ethanol (unvergällt)
- 1x kurz\_ DEPC-H<sub>2</sub>O
- 5min.\_ sterilisieren bei 180°C (Trockenschrank)

#### 2.) Nach dem Erkalten

- 15sec.\_ Silan: 5ml Silan in 250ml Aceton
- (Silan = 3-Aminopropyltriethoxysilan, Sigma)
- 2x kurz\_ Aceton
- 1x kurz\_ DEPC-H<sub>2</sub>O
- Über Nacht bei 37-42°C trocknen lassen

### 2.3.9 ISH an Paraffinschnitten

#### Tag 1:

- 2x 10min\_in Xylol
- 2x 5min\_in 100% Ethanol
- 1min\_in 95% Ethanol
- 1min\_in 90% Ethanol
- 1min\_in 80% Ethanol
- 1min\_in 70% Ethanol
- 1min\_in 50% Ethanol
- 1min\_in 30% Ethanol
- 5min\_in 1x PBS
- 30min\_in 4%Pfa/PBS
- 2x 5min\_in PBS
- 30s\_in ProteinaseK in PBS

- 2x 5min\_in PBS
- 15min\_in 4%Pfa/PBS
- 2x 5min\_in PBS
- 2x 5min\_in 2x SSC
- 30min\_in Tris-Glycinpuffer
- Über Nacht\_Hybridisierungsmix 60µl/OT, Deckglas, bei 65°C im Wasserbad, in Quadripermschalen (Heraeus), in feuchter Kammer mit 5x SSC + 40% Formamid

**Tag 2:**

- 3x 15min\_in 5x SSC bei 60°C
- 40min\_in 20% Formamid/0,5x SSC bei 60°C
- 15min\_in 2x SSC bei RT
- 15min\_in RNase A in 2x SSC bei 37°C
- 15min\_in 2x SSC bei RT
- 20min\_in 20% Formamid/0,5x SSC bei 60°C
- 2x 15min\_in 2x SSC
- Über Nacht\_Antikörper (anti-DIG-AP-Fab in 1% Blockierungslösung, 1:4000, 200µl/OT) bei 4°C in feuchter Kammer mit 2x SSC

**Tag 3:**

- 3x 10min\_in TBS bei RT
- 3x 30min\_in TBS bei RT
- 2x 60min\_in TBS bei RT
- 3x 10min\_NTMT AP-Puffer
- 2ml Färbelösung pro Fach, im Dunkeln bei RT inkubieren
- Nach 3-16h Farbreaktion stoppen durch dreimaliges Schwenken in 1x PBS mit 1mM EDTA, dann in Aqua bidest.
- Dehydrieren bis 100% Ethanol
- Eindeckeln mit Enthellan und lufttrocknen

1x TBS pH7,4	
50mM	Tris-HCl Sigma
150mM	NaCl



1x TBST pH7,4	
1x TBS	Eigene Herstellung
0,1% Tween-20	Sigma

0,5M EDTA pH 8,0	
20,0g	NaOH (Merck)
186,1	EDTA (Sigma)
Die Bestandteile wurden in 800ml ddH <sub>2</sub> O gelöst und für mehrere Stunden gerührt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt.	
EDTA: fängt Ca <sup>2+</sup>	

10%ige Blocking-Lösung	
10%ige	Blocking-Reagenz (Boehringer Mannheim)
100mM	Maleinsäure (Sigma)
150mM	NaCl (steril, pH7,5)

4% Pfa in PBS	
400ml	DEPC-PBS
16g	Paraformaldehyd
Die Paraformaldehydlösung wurde im Wasserbad bei 65°C für ca. 1h gelöst und anschließend auf Eis abgekühlt.	

Tris-Glycin-Puffer	
20ml	10x Tris-Glycin
Es wurde mit DEPC-H <sub>2</sub> O auf 200ml aufgefüllt.	

Hybridisierungsmix	
600µl	Formamid
375µl	20x SSC
15µl	Denhard's
15µl	Heringssperma-DNA
15µl	tRNA
465µl	DEPC-H <sub>2</sub> O
Alle Bestandteile wurden gründlich gemischt.	

PBS mit 1mM EDTA	
30ml	20x PBS
1,2ml	0,5M EDTA
Die Bestandteile wurden mit dd-H <sub>2</sub> O auf 600ml aufgefüllt.	

### 2.3.10 Kryoschnitte

Nach dem Entfernen der embryonalen Hüllen wurden die Embryonen für 30min in 5%ige Sucrose-Lösung verbracht. Danach wurden sie über Nacht in 15%iger Sucrose gelagert (Verdünnung mit PBS). Das „Einblocken“ erfolgte am nächsten Tag. Vor dem Erstellen des Kryoblocks wurden die Embryonen für 1h in das Einbettmedium Kryolan (Kryolan) eingelegt, während in der Zwischenzeit aus Aluminiumfolie kleine „Särgchen“ vorbereitet wurden. Die Särgchen wurden zur Hälfte mit Kryolan gefüllt und dann auf einer in flüssigem Stickstoff stehenden Metallbrücke gefroren. Nachdem das Kryolan erstarrt war, wurde der Embryo in der gewünschten Ausrichtung daraufgelegt, vollständig mit Kryolan übergossen und über flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei nicht sofortiger Verwendung wurden die Embryonen bei -80°C gelagert.

In einem Kryotom (Leica) wurden bei -20° 12µm dicke Schnitte angefertigt und anschließend auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen.

Gelatine-Objektträger	
100ml	Aqua bidest.
0,5g	Gelatine (Sigma)
0,05g	KCr (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 12H <sub>2</sub> O (Kaliumchrom-(III)-sulfat, Merck)
Alle Bestandteile wurden bei 60°C gelöst. Die Objektträger wurden dann in die flüssige Gelatinelösung eingetaucht und danach zum Trocknen aufgestellt.	

### 2.3.11 Fluoreszenz-Doppelmarkierung

#### 2.3.11.1 Protokoll für die Fluoreszenz-Doppelmarkierung von Kryoschnitten:

- 1.) Blockierung mit 1%BSA/PBS\_für 30min
- 2.) Erster Antikörper (Desmin, polyklonal, Verdünnung 1:400 / Pax7 monoklonal unverdünnt / GFP)\_über Nacht
- 3.) Waschung in PBS\_3x für 5min
- 4.) Zweiter Antikörper (Cy2 anti Kaninchen(grün), Cy3 anti Maus(rot)/ Verdünnung 1:200)\_für mind. 90min im Dunkeln unter einem Deckglas
- 5.) Waschung in PBS\_3x für 5min
- 6.) Eindeckeln mit Mowiol

Erster Antikörper	
Maus-anti-Flag monoklonal 1:500	Sigma (Anti-Flag M2 Monoklonal-Antikörper-FITC Conjugat)
Kaninchen-anti-Aktin monoklonal 1:5	Biozol-Monosan

Zweiter Antikörper	
Cy3 Ziege-anti-Kaninchen 1:200	DAKO
CY3 Ziege-anti-Maus 1:200	DAKO
FITC Ziege-anti-Maus 1:200	DAKO

### 2.3.12 Dokumentation von Gewebeschnitten

Zur Dokumentation der Gewebeschnitte wurde ein Axioskop von Zeiss in Verbindung mit einer Digitalkamera von Leica (DFC 320) verwendet. Für fluoreszierendes Gewebe musste zusätzlich eine Fluoreszenzlampe (Zeiss, HBO 50W) benutzt werden.

### 2.3.13 Untersuchung von Zelluntergängen

*Bei der Untersuchung auf Zelluntergänge wird überprüft, ob durch die Elektroporation eine tatsächliche Herunterregulierung eines bestimmten Entwicklungsfaktors ausgelöst wurde, oder ob es sich lediglich um eine Zerstörung von Zellen durch die Elektrizität handelt.*

Elektroporierte und über Nacht inkubierte Embryonen wurden in eine Nil-Blau-sulfat-Lösung mit einer Verdünnung von 1:20000w/v (mit PBS) verbracht und für 30min bei 37°C inkubiert (van den Eijnde et al., 1997). Danach erfolgte ein Waschen in PBS und die Embryonen wurden sofort auf Eis verbracht und die Befunde mit einer Digitalkamera dokumentiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Herstellung einer RNA-Sonde

Nach erfolgreichen Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* (Kremer, Diplomarbeit 2007) war es nun Aufgabe dieser Dissertation herauszufinden, welche Rolle *Flightless-I* in der Embryonalentwicklung von Vertebraten zukommt.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, empfahl es sich, sowohl das Expressionsmuster von *Flightless-I* zu analysieren als auch Experimente hinsichtlich der Funktion dieses Gens durchzuführen.

Mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung kann gezeigt werden, in welchem Entwicklungsstadium und in welchen embryonalen Strukturen bzw. Organen ein Gen zum Zeitpunkt der Fixation abgelesen wurde.

Um Einblicke in die Aktivität von *Flightless-I* zu bekommen, wurde mit der Technik der In-situ-Hybridisierung am Hühnchen gearbeitet.

Zunächst war es notwendig, mittels In-situ-Hybridisierung eine Expressionsstudie durchzuführen, um herauszufinden, in welchen embryonalen Strukturen des Hühnchens *Flightless-I* aktiv ist. Danach galt es, in einer Funktionsanalyse, mit Hilfe der Überexpression, den Einfluss von *Flightless-I* auf andere Entwicklungsfaktoren zu testen.

Die volle Gensequenz von *Flightless-I* wurde, einkloniert in einen Vektor, vom Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München bezogen (Abb. 3.1).

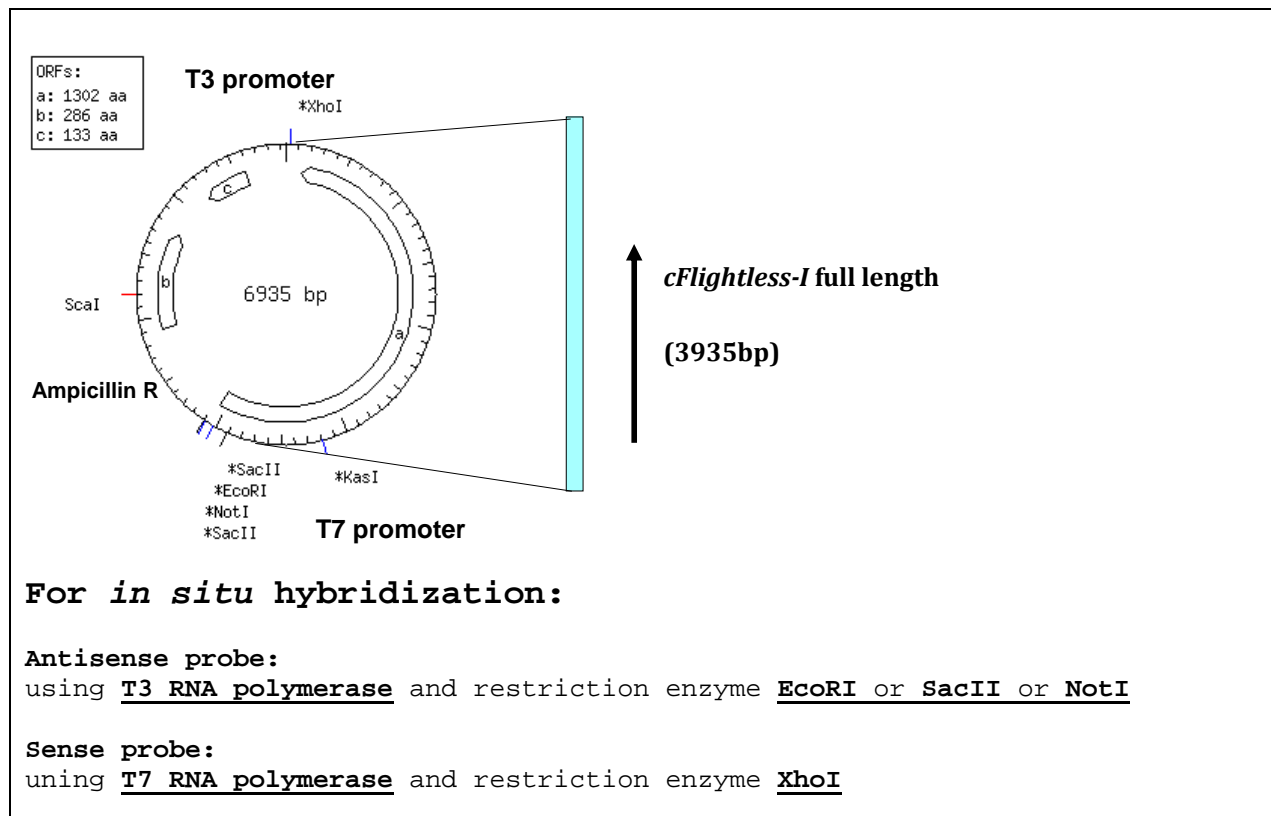


Abb. 3.1 Plasmid mit der „full length“ von *Flightless-I*

Für die Herstellung der RNA-Sonde wurde, wie bereits in Material und Methoden beschrieben, das doppelsträngige DNA-Plasmid linearisiert, mit Digoxigenin markiert und anschließend transkribiert.

Um für die Linearisierung geeignete Schnittstellen für die Restriktionsenzyme zu finden, wurde das Plasmid von der Firma MWG-Biotech vollständig sequenziert.

Im Folgenden sind einige Ausschnitte aus der Sequenzierung der Sense- und Antisense-Probe dargestellt (Abb. 3.2 und Abb. 3.3).

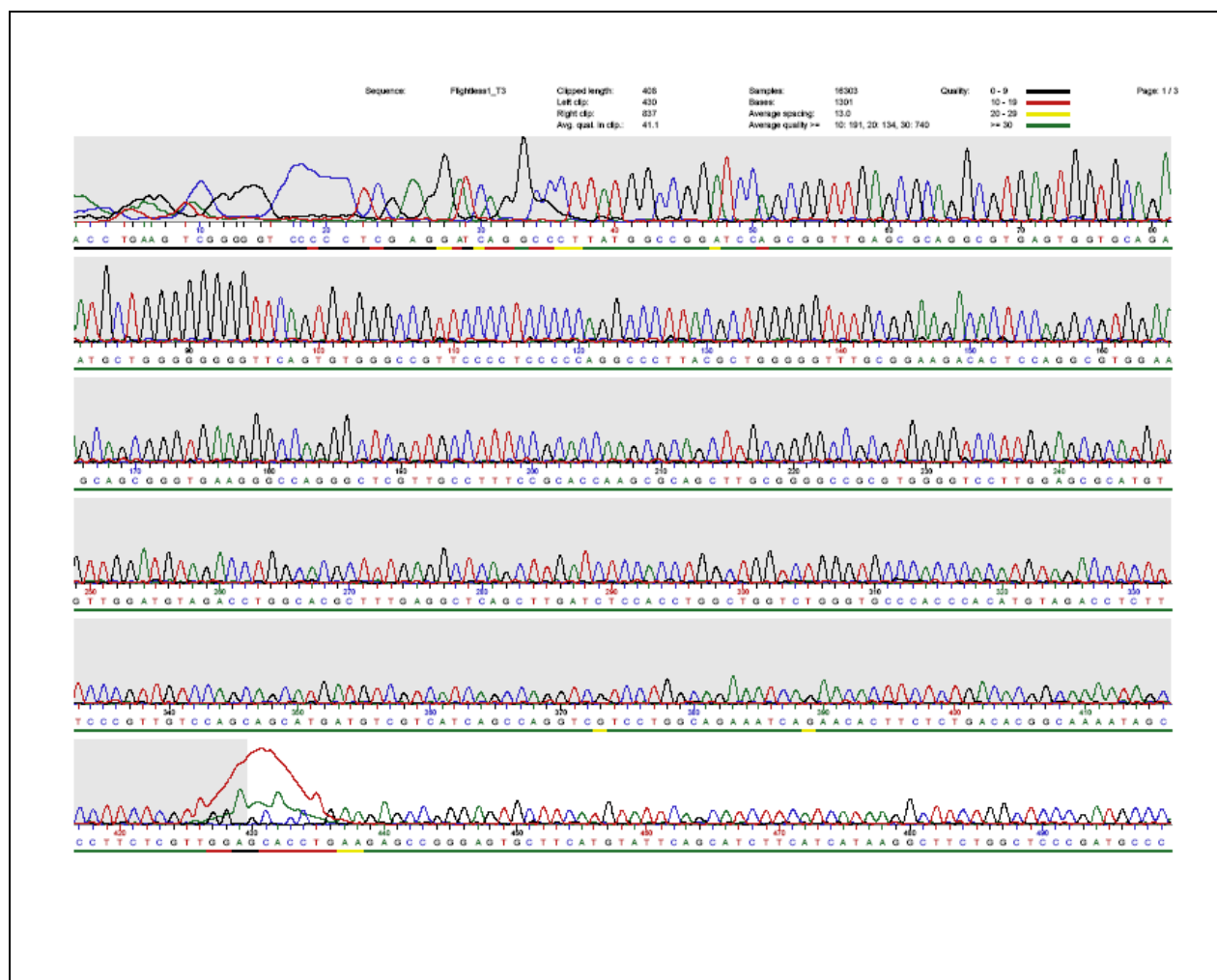


Abb. 3.2 Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Sequenzierung für die Antisense-Probe von *Gallus gallus* *Flightless-I*

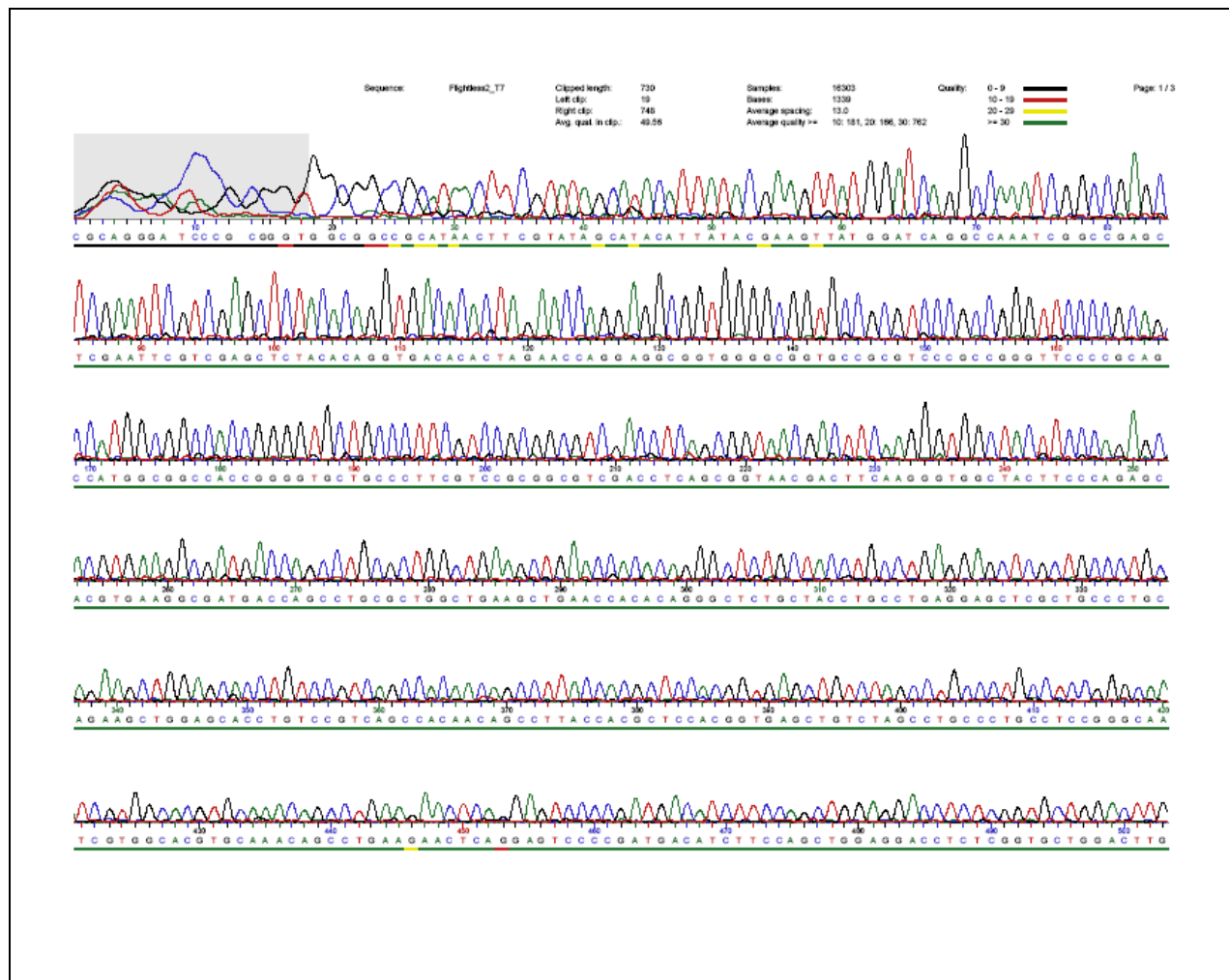


Abb. 3.3 Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Sequenzierung für die Sense-Probe von *Gallus gallus* *Flightless-1*

### 3.2. Expressionsstudie

Für die Expressionsstudie wurden mit der Technik der In-situ-Hybridisierung Embryonen der Stadien HH4 bis HH37 untersucht. Dies entspricht einer Bebrütungsdauer von 18 Stunden bis 11 Tagen. Abbildung 3.4 gibt einen Überblick über die verschiedenen Entwicklungsstadien der Embryonen nach In-situ-Hybridisierung mit *Flightless-1*.

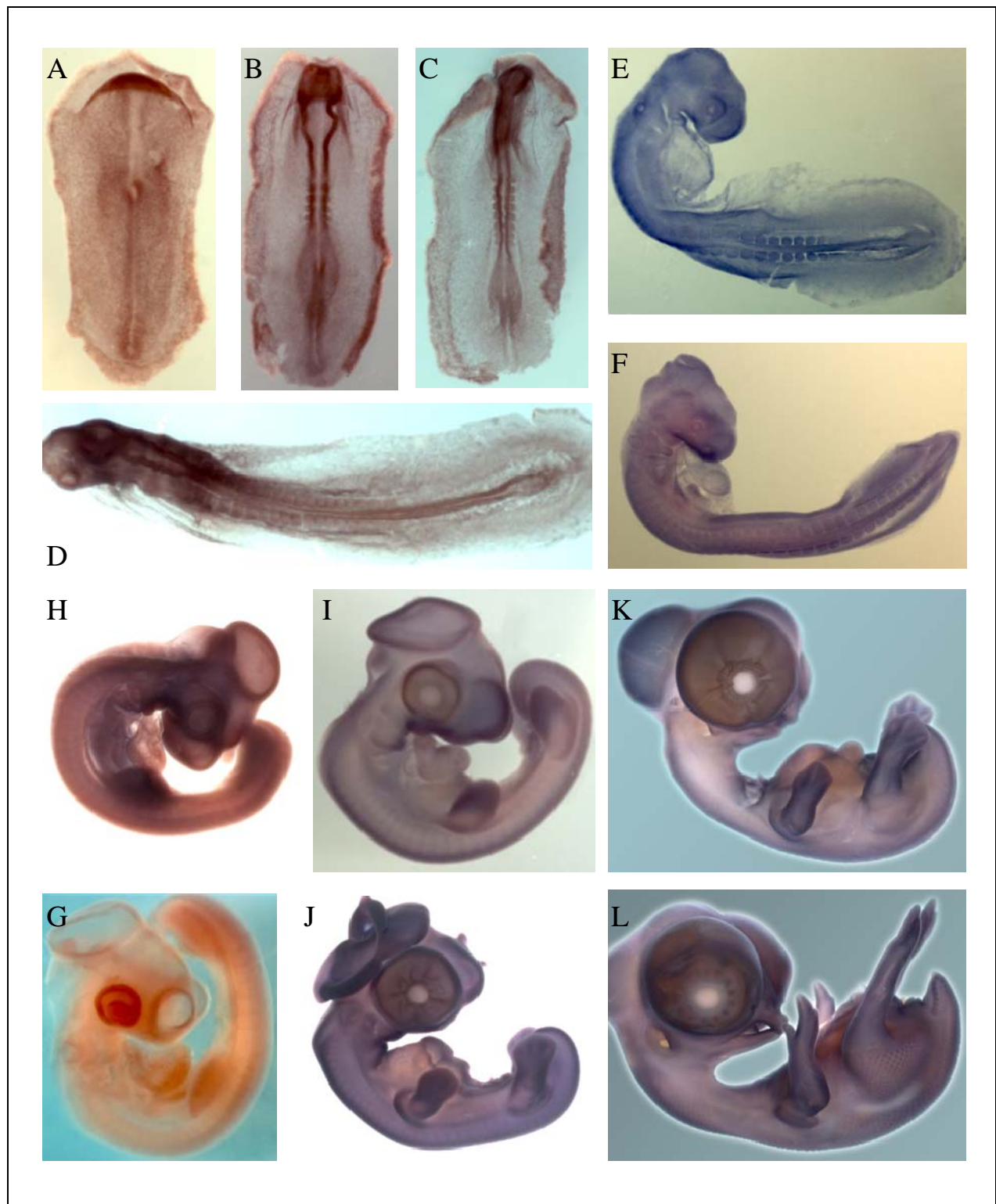


Abb. 3.4 Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien nach In-situ-Hybridisierung mit *Flightless-I* „full length“. In A-F und H-L sind die Ergebnisse der Anti-Sense-Probe dargestellt, wohingegen G das Ergebnis der Sense-Probe (Negativprobe) zeigt.

A: HH06 (23-25h Bebrütung), B: HH08 (26-29h Bebrütung), C: HH09 (29-33h Bebrütung), D: HH12 (45-49h), E: HH14 (50-53h), F: HH17 (52-64h), G: HH19 (3-3,5d, 37-40 Somiten), H: HH20 (3-3,5d, 40-43 Somiten), I: HH23 (4d), J: HH27 (5-5,5d), K: HH30 (6,5-7d), L: HH37 (11d)



Zunächst wurden alle In-situ-Hybridisierungen mit der vollen Gensequenz (full length) von *Flightless-I* durchgeführt. Die Sonde mit 3935bp ergab bereits nach 20min Färbezeit ein Signal und die Reaktion konnte schon nach 40min abgestoppt werden. Die Färbung war kräftig (violette Färbung) und, um Hintergrundfärbungen auszuschließen, wurden einige der Embryonen in Methanol oder Dimethylformamid geklärt (blaue Färbung).

Kleine und mittlere Stadien konnten auf diese Weise mühelos untersucht werden. Jedoch ergab sich ab Stadium HH20 ein Problem: Die Sonde war, eventuell aufgrund ihrer überdurchschnittlichen Länge, nicht mehr in der Lage, das Gewebe vollständig zu durchdringen, und so entstanden abweichende Ergebnisse zwischen der In-situ-Hybridisierung, durchgeführt an „whole mounts“ (Totalpräparate), und der ISH an Paraffinschnitten.

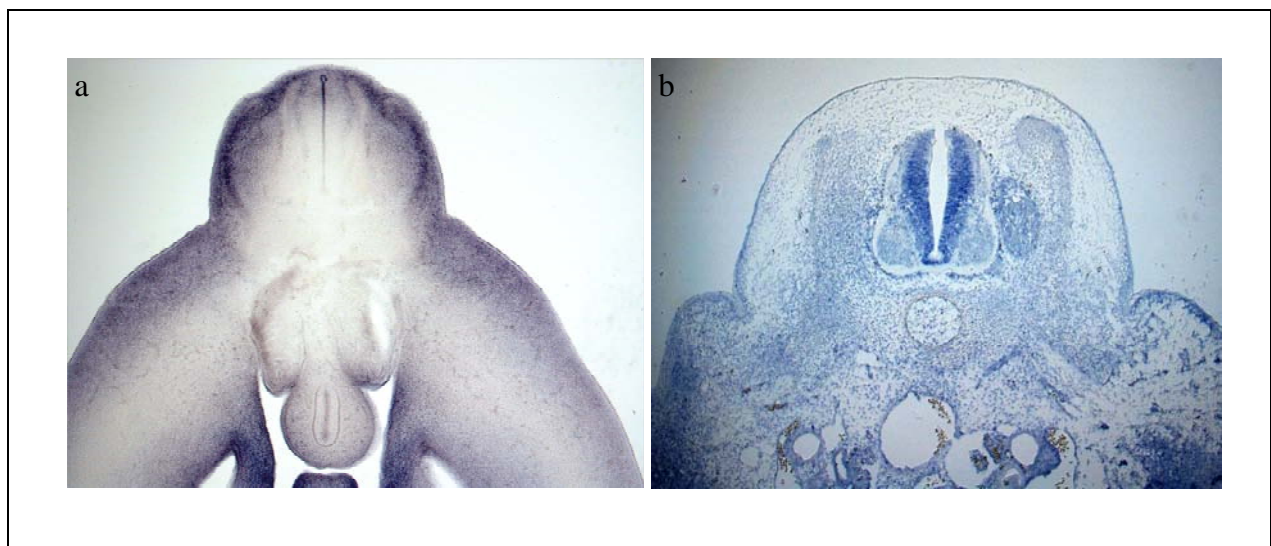


Abb. 3.5 Abbildung a links: Zeigt einen Querschnitt durch einen Embryo Stadium HH25 auf Höhe des Flügels (ISH durchgeführt an Whole mounts, anschließendes Anfertigen von Vibratomschnitten)

Abbildung b rechts: Zeigt einen Querschnitt durch einen Embryo Stadium HH25 auf Höhe des Flügels (ISH durchgeführt an Paraffinschnitten)

Deutlich zu sehen ist die unterschiedliche Färbung zwischen der ISH durchgeführt an Whole mounts (links) und der ISH durchgeführt an Paraffinschnitten (rechts). Links ist das Signal nur auf die äußeren Randbereiche beschränkt, wohingegen rechts auch tiefer gelegene Strukturen eine Färbung aufweisen. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich das Signal keineswegs nur, wie anfänglich beobachtet, auf die äußeren Randbezirke des Embryos erstreckt (Abb. 3.5a), sondern in sämtlichen Organen des Hühnchens zu diesem Entwicklungszeitpunkt vorhanden ist (Abb. 3.5b).

Die Abbildung 3.5a zeigt das Signal von *Flightless-I* nur in den äußeren Randbereichen. Dies ist möglicherweise auf die begrenzte Durchdringung zurückzuführen. Diese Art der Färbung

zeigt sich bei Embryonen ab Stadium HH20 und setzt sich bis in alle älteren Stadien fort (getestet wurde bis Stadium HH36), wobei die Breite des violett gefärbten Signalstreifens mit zunehmendem Alter der Embryonen abnimmt, bis nur noch ein sehr dünner Randstreifen in den äußeren Schichten übrig bleibt.

In parallel dazu durchgeführten Versuchsansätzen, in denen die In-situ-Hybridisierung direkt an Paraffinschnitten durchgeführt wurde, entstanden von Stadium HH20 bis Stadium HH36 völlig abweichende Ergebnisse. Wie hier in der Abbildung 3.5b an einem Querschnitt durch einen Embryo des Stadiums HH25 dargestellt, ist das Signal keineswegs nur auf die Randbereiche beschränkt, sondern zeigt sich auch deutlich in tiefer gelegenen Geweben. Ausgehend von diesen Befunden wurden alle Stadien (HH06-HH36) überprüft und festgestellt, dass die anfänglich gefundene, auf den äußeren Rand beschränkte Färbung, durch die Durchdringung aufgrund der großen Sonde begrenzt wird.

Auch das Zerteilen der „whole mounts“ in kleinere Stücke (Längsspaltung und Abtrennung der Gliedmaßen) und anschließende In-situ-Hybridisierung erbrachte keine übereinstimmenden Ergebnisse mit den Paraffinschnitten. Die Färbung war stets auf die Randbereiche und die Schnittoberflächen beschränkt.

Um die Vermutung zu überprüfen, dass die Sonde mit ihrer überdurchschnittlichen Länge von 3935bp nicht mehr in der Lage war, dickere Gewebeschichten zu penetrieren, wurde ein erneuter Versuchsansatz gestartet, in dem die „full length“ von *Flightless-I* in drei kleinere Teilstücke zerlegt wurde, um eine tiefere Durchdringung zu ermöglichen und im Idealfall die Ergebnisse der Paraffinschnitte zu bestätigen (siehe Kapitel 3.2.1).

### 3.2.1 Konstruktion von drei verschiedenen *cFlightless-I* Fragmenten in pDrive-Vektor

Ausgangspunkt für die Konstruktion der Fragmente war ein *pDrive-cFlightless-I-Plasmid*, das die vollständige Gensequenz (full length) von *Fli-I* enthält.

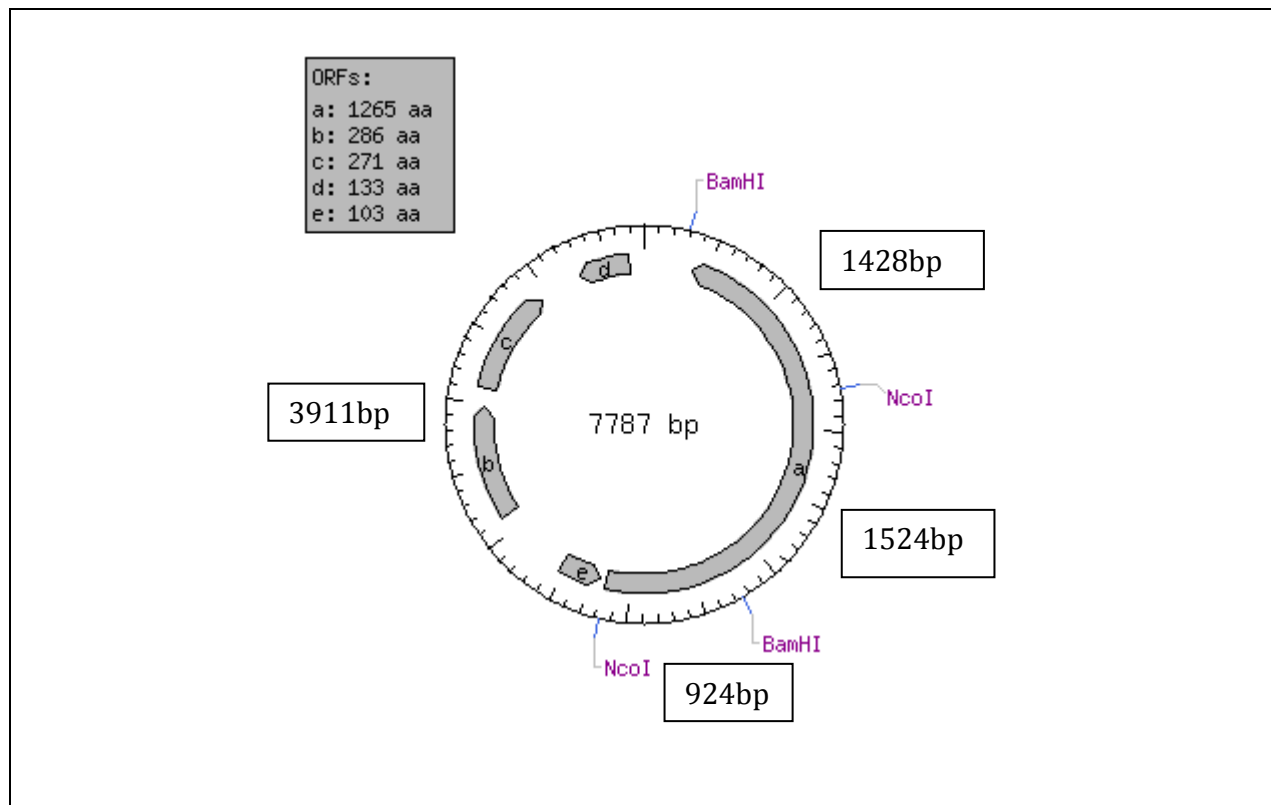


Abb. 3.6 Das *pDrive-cFlightless-I-Plasmid* mit 7787bp. Es sind lediglich die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme *BamHI* und *NcoI* eingezeichnet. Oben rechts auf dem Plasmid beginnend, liegt zwischen den Schnittstellen *BamHI* und *NcoI* das 1428bp lange 3'Ende-Fragment von *cFlightless-I*, gefolgt von dem Mittelstück mit 1524bp zwischen den Schnittstellen *NcoI* und *BamHI* und schließlich das kleinste Teilstück mit 924bp zwischen den Schnittstellen *BamHI* und *NcoI*.

Das *pDrive-cFlightless-I-Plasmid* besitzt 7787bp, wobei die Größe des *pDrive-Vektors* 3911bp und die Größe des *Fli-I-Gens* 3876bp beträgt. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BamHI* und *NcoI* konnte *Fli-I* in drei Teilstücke zerlegt werden (Abb. 3.6).

Das kleinste Fragment am 5'Ende betrug 924bp, wohingegen das Fragment am 3'Ende eine Größe von 1428bp aufwies. Das größte Teilstück, das sogenannte „Mittelstück (middle part)“, betrug 1524bp. Erwartungsgemäß sollte dieses auch die höchste Spezifität aufweisen.

Als erstes wurde das *pDrive-cFlightless-I-Plasmid* (7787bp) mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* geschnitten. Aus der Restriktion gingen zwei Teilstücke hervor. Das größere Stück

wies eine Länge von 4835bp auf und enthielt den Vektor pDrive (3911bp) und das kleinste der drei *cFlightless-I* Fragmente, das 5'Ende mit 924bp. Durch Selbstligation dieses großen Teilstückes entstand das erste der drei Konstrukte. Das kleine Teilstück, das aus der ersten Restriktion hervorgegangen war (2952bp), fand für die weitere Konstruktion keine Verwendung.

Um das zweite Konstrukt zu erhalten, wurde *pDrive-cFlightless-I* (7787bp) mit dem Restriktionsenzym *NcoI* geschnitten. Es entstanden wieder zwei Teilstücke. Das größere Stück enthielt mit einer Länge von 5339bp den pDrive-Vektor und das 3'Ende mit 1428bp. Durch erneute Selbstligation dieses großen Stückes entstand das zweite Konstrukt. Das zweite, aus der Restriktion hervorgegangene Fragment (2448bp), wurde für die weitere Konstruktion verwendet.

Zur Gewinnung des dritten *cFlightless-I*-Konstrukts wurde das aus der zweiten Restriktion mit *NcoI* gewonnene große Teilstück (5339bp) mit *BamHI* geschnitten. Das Ergebnis war die Gewinnung des pDrive-Vektors (3911bp) und des 3'Ende-Fragments (1428bp). Das aus der zweiten, mit *NcoI* durchgeführten, Restriktion erhaltene kleine Teilstück (2448bp) wurde ebenfalls mit *BamHI* geschnitten. Daraus ergaben sich das kleine 5'Ende-Fragment mit 924bp und das 1524bp lange Mittelstück. Durch Ligation des pDrive-Vektors mit dem Mittelstück (1524bp) wurde das dritte Fragment von *cFlightless-I* konstruiert. Abbildung 3.7 und 3.8 zeigen die nach Restriktion gewonnenen Fragmente in der Gelelektrophorese.

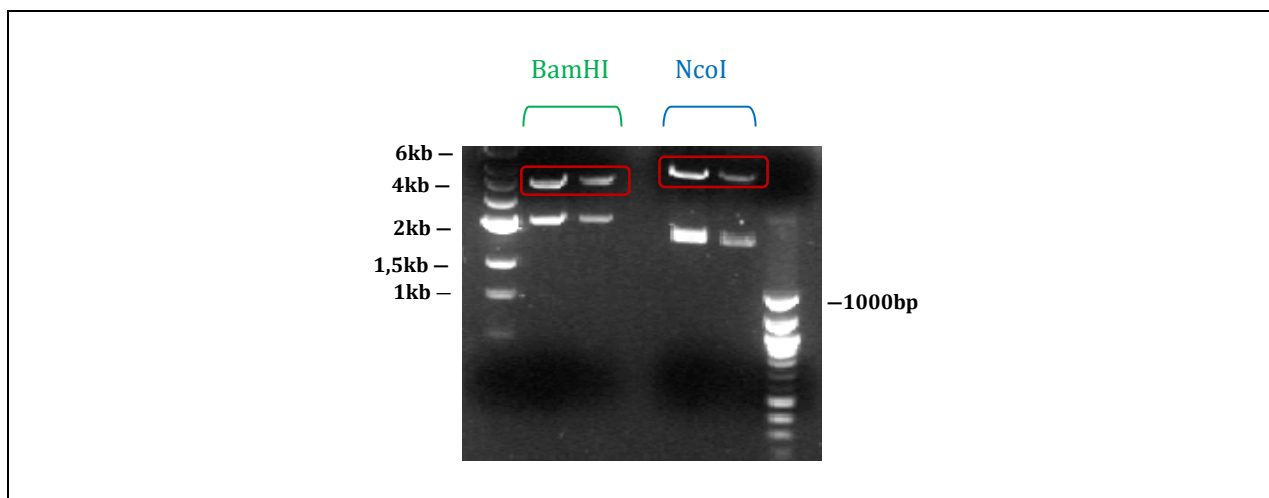


Abb. 3.7 Präparation der drei Fragmente von *cFlightless-I*:

Links: enzymatische Verdauung von *pDrive-cFlightless-I* mit *BamHI*. In der Gelelektrophorese werden jeweils zwei Banden sichtbar. Bei den oberen Banden handelt es sich um das 4835bp lange Fragment, das sowohl den Vektor *pDrive* als auch das 5'Ende-Fragment von *cFlightless-I* enthält. Durch Selbstligation entsteht das erste der drei gesuchten Fragmente. Bei den beiden unteren Banden handelt es sich um das 2952bp lange Fragment, das in der weiteren Konstruktion keine

Verwendung findet.

Rechts: enzymatische Verdauung von pDrive-cFlightless-I mit *NcoI*. Die beiden oberen Banden zeigen das 5339bp lange Teilstück, das zum einen den pDrive-Vektor und zum anderen das 3'Ende-Fragment von cFlightless-I enthält. Durch Selbstligation wird das zweite cFlightless-I-Fragment erhalten.

(Es wurden jeweils zwei DNA-Proben in das Agarosegel eingebracht.)

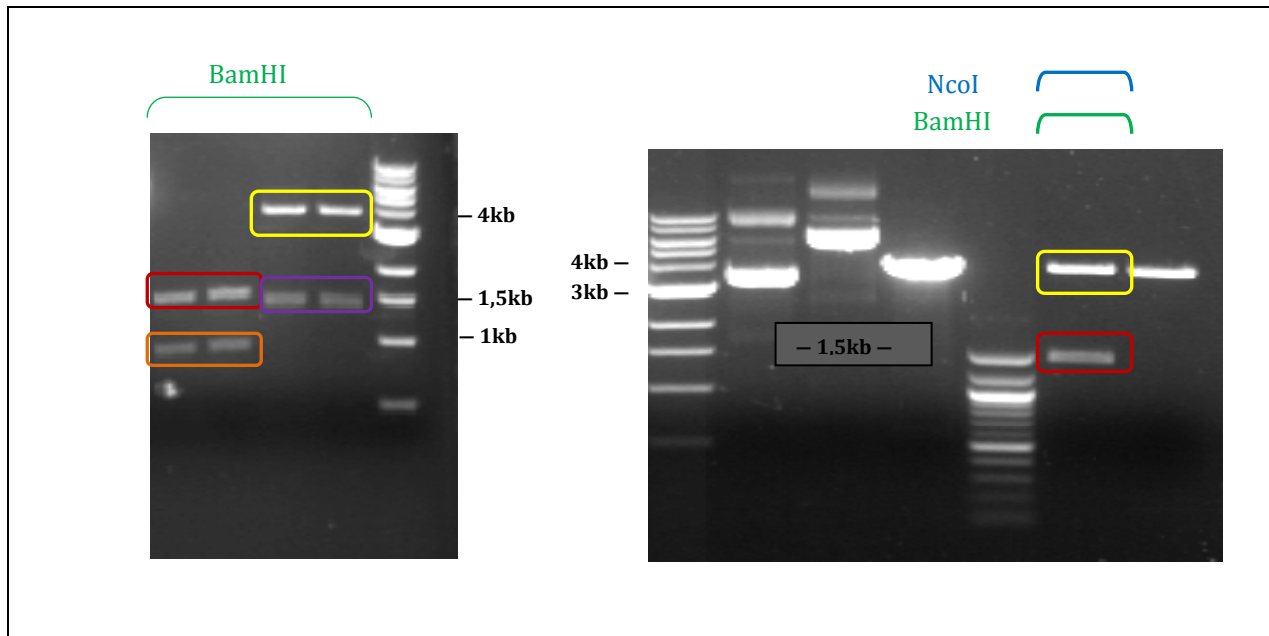


Abb. 3.8 Links: Aus der enzymatischen Verdauung des pDrive-cFlightless-I mit *NcoI* waren zwei Teilstücke hervorgegangen. Das größere Stück wies eine Länge von 5339bp auf und das kleinere eine Länge von 2448bp. Beide Teilstücke wurden, wie oben gezeigt, mit *BamHI* enzymatisch verdaut. Aus dem größeren Stück gingen der pDrive-Vektor mit 3911bp und das 3'Ende-Fragment von cFlightless-I mit 1428bp hervor. Die Restriktion des kleinen Stücks ergab das Mittelstück mit 1524bp und das 5'Ende-Fragment mit 924bp von cFlightless-I. Das Mittelstück und der pDrive-Vektor wurden ligiert und so das dritte Fragment von cFlightless-I erhalten.

Rechts: Überprüfung auf positive Klone. Um sicher zu gehen, dass das dritte Teilstück korrekt ligiert wurde, wurde der positive Klon mit Hilfe von *BamHI* und *NcoI* nochmals überprüft. Das Ergebnis ergab zwei Banden mit exakt den richtigen Längen für pDrive und das Mittelstück von cFlightless-I.

Mit allen drei neu gewonnenen Teilstücken von *Flightless-I* wurden In-situ-Hybridisierungen an „Whole mounts“ durchgeführt. Alle drei Teilstücke zeigten eine stärkere Durchdringungstiefe, wobei das Mittelstück, welches das spezifischste Teilstück von allen war, die stärkste Durchdringung erreichte, während das große und das kleine Teilstück bei geringerer Intensität eine ähnliche Durchdringungstiefe erzielten.

Mit dem Mittelstück konnte nun eine vollständige Durchdringung bis Stadium HH24 erreicht werden. Aber bereits ab Stadium HH25 ergaben sich ähnliche Bilder wie mit der „full length“, in denen stets der innerste Bereich der Gewebeschnitte ungefärbt blieb.

Da mit der Technik der „Floating In-situ-Hybridisierung“, bei der die Embryonen zuerst in Agarose-Gel eingebettet, dann mit dem Vibratom in mikrometerfeine Schnitte zerteilt werden und erst anschließend an diesen Schnitten die ISH durchgeführt wird, auch keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden konnten, wurden alle Aussagen des Expressionsmusters über Embryonen ab Stadium HH25 auf die Ergebnisse der Paraffinschnitt-ISH gestützt.

### **3.2.2 Expression von *Flightless-I***

#### **3.2.2.1 Hensenscher Knoten und Primitivstreifen**

Die Expression von *Fli-I* beginnt schon in den frühen Stadien der Entwicklung. Ab Stadium HH04 zeigt sich in der Area pellucida und im Primitivstreifen deutlich das Signal, welches in beiden sich entwickelnden Strukturen fortan konstant bleibt. Die Expression im Primitivstreifen konzentriert sich im Whole mount auf die Primitivfalten, wohingegen die Primitivrinne ein abgeschwächtes Signal aufweist (Abb. 3.9A).

Mit dem Auftreten des Hensenschen Knotens in Stadium HH05 wird *Fli-I* auch dort exprimiert. Hierbei wird deutlich, dass die Expression im Knoten auffallend asymmetrisch verläuft und eine der beiden Seiten stets stärker gefärbt ist als die andere, während das Zentrum grundsätzlich kein Signal aufweist. In Querschnitten durch den Primitivknoten konnte diese Asymmetrie jedoch nicht gezeigt werden. Die ungleiche Färbung lässt sich bis Stadium HH08 verfolgen und verliert sich dann ab Stadium HH09 (Abb. 3.9A-C).

Cranial des Hensenschen Knotens setzt sich die Färbung entlang der entstehenden Neuralrinne in den Neuralfalten fort und breitet sich auch auf die Neuralplatte aus (Abb. 3.9A).

Eine weitere primitive Struktur, die *Flightless-I* exprimiert, ist die Kopffalte am cranialen Ende des Embryos (Abb. 3.9A).

In Querschnitten (Abb. 3.9 a,b,c), hier gezeigt durch einen Embryo des Stadiums HH06, wird deutlich, dass im cranialen Bereich sowohl die Neuralfalten als auch die Neuralrinne das Signal aufweisen. In weiter caudal gelegenen Schnitten durch den Primitivknoten und den Primitivstreifen zeigt sich, dass alle drei Keimblätter, Ektoderm, Mesoderm und Entoderm, *Flightless-I* exprimieren. In den Abbildungen 3.9b und c fällt auf, dass sich das Signal am basalen Rand des Ektoderms zusätzlich verstärkt.

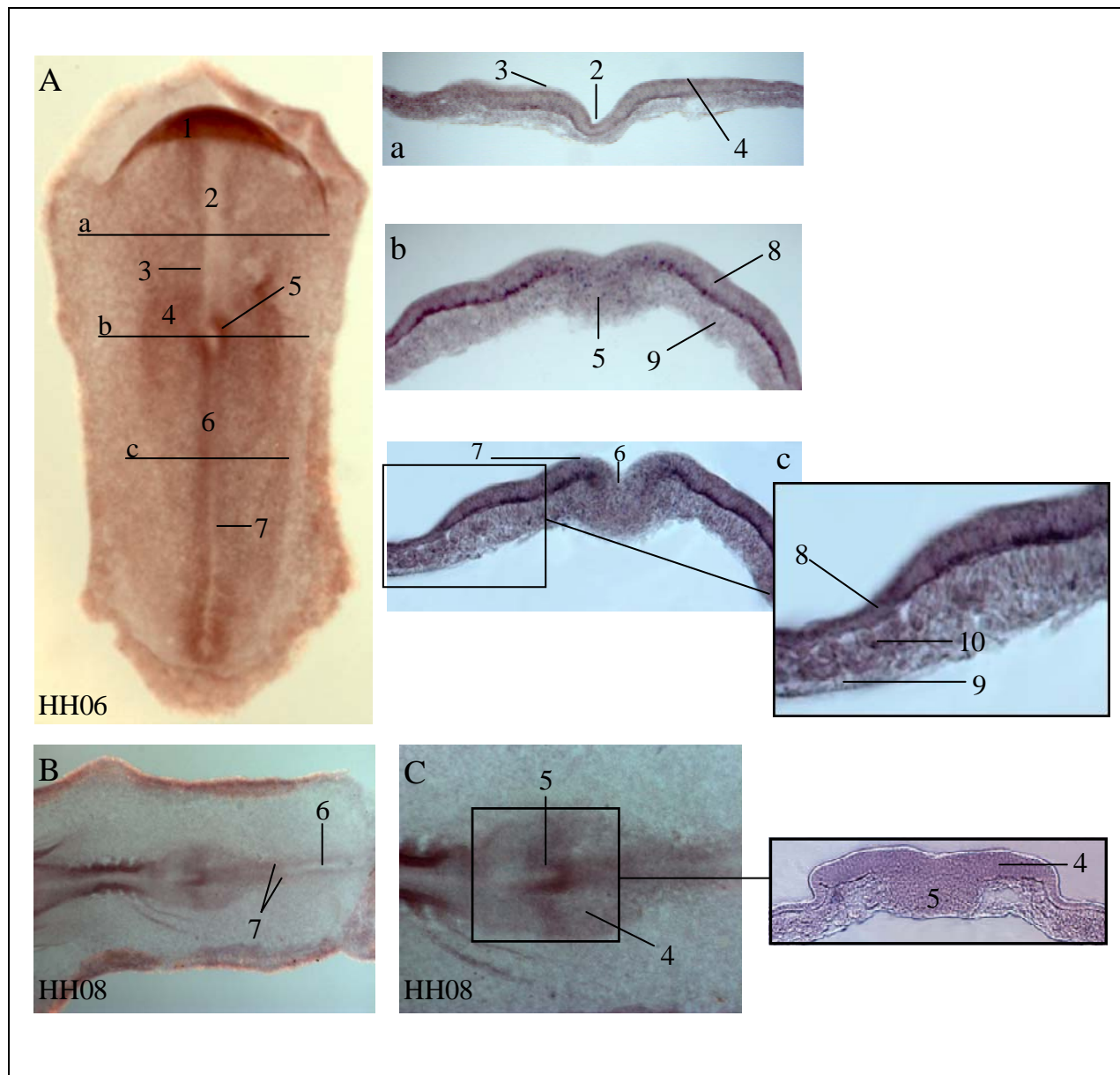


Abb. 3.9 Hensenscher Knoten und Primitivstreifen

A-C: Whole mounts

a: Transversalschnitt auf Höhe des Kopffortsatzes

b: Transversalschnitt durch den Hensenschen Knoten

c: Transversalschnitt durch den Primitivstreifen

1 = Kopffalte des Körpers

2 = Neuralrinne

3 = Neuralfalte

4 = Neuralplatte

5 = Hensenscher Knoten (Primitivknoten)

6-7 = Primitivstreifen mit Primitivrinne (6) und Primitivfalte (7)

8 = Ektoderm

9 = Entoderm

10 = Mesoderm



### 3.2.2.2 Nervensystem: Neuralrohr, Gehirn, Rückenmark und Ganglien

#### **Neuralrohr**

Mit der fortschreitenden Entwicklung des Embryos und dem Ersatz des Primitivstreifens durch die Neuralrinne mit Neuralfalte und angrenzender Neuralplatte bleibt die Expression von *Flightless-I* in diesen frühen neuronalen Strukturen bestehen. Die Expression zeigt sich, wie in Abbildung 3.10B dargestellt, deutlich in den Neuralfalten und bleibt auch im sich schließenden Neuralrohr erhalten.

Wie in den Querschnitten Abb.3.10a-d gezeigt, ist das Signal gleichmäßig über alle Zellen des Neuralrohrs verteilt. Im Schnitt durch Stadium HH14 (Abb.3.10c) lässt sich eine verstärkte Färbung am rechten und linken Randbereich des Neuralrohrs erkennen, was auch im Querschnitt durch Stadium HH17 (Abb.3.10d) sichtbar wird. Zusätzlich zeigt sich in Abbildung d eine verstärkte Ausprägung des Signals in den subektodermal gelegenen Strukturen des Neuralrohrs, die sich auch nach lateral über den Dorsalrand der Somiten fortsetzt (gekennzeichnet durch rote Pfeile).

#### **Gehirn**

In den Stadien HH08-HH10+ (Abb. 3.11A-C) lassen sich bereits die ersten Auftreibungen des Neuralrohrs zu künftigen Hirnbläschen erkennen. Die Expression von *Flightless-I* bleibt mit gleicher Intensität wie im Neuralrohr auch in diesen Strukturen bestehen. Beginnend mit dem Ektoderm des Kopfes, setzt sich das Signal von *Fli-I* durch die primitiven, anfänglich blasenartig gestalteten Gehirnstrukturen fort. Vom Prosencephalon, mit Tel- und Diencephalon, über das Mesencephalon, gefolgt von Rhombencephalon, welches in Met- und Myelencephalon unterteilt wird, erstreckt sich die Expression schließlich bis hinein ins Rückenmark (Abb. 3.11C-H).

In Abbildung 3.11C ist eine verstärkte Signalausprägung im Bereich des Infundibulums, zwischen Pros- und Mesencephalon, zu erkennen. Desweiteren zeichnet sich die Expression deutlich in den Rhombomeren des Myelencephalon ab (Abb. 3.11E).

In älteren Stadien, wie z.B. Stadium HH30, hier Abbildungen 3.11d-e, lässt sich bereits in Tel- und Diencephalon eine Gewebeschichtung erkennen. Die Stärke der Expression erhöht sich dabei auf luminaler Seite.

#### **Rückenmark und Ganglien**

Zwischen den Somiten entsteht aus dem Neuralrohr von cranial nach caudal das Rückenmark. Von außen betrachtete „Whole mounts“ zeigen ein homogenes Expressionsmuster der Medulla spinalis. Bis Stadium HH24 entspricht dies auch weitestgehend der Realität. Jedoch bei genauerer Analyse von Querschnitten ab Stadium HH25 zeigen sich mit der Ausbildung



einer differenzierteren Gewebestruktur im Rückenmark auch gut sichtbare Unterschiede in der Intensität der Expression von *Flightless-I*.

In den Abbildungen 3.12A und a ist deutlich zu erkennen, dass die stärkste Expression sich in der ventrikulären Schicht des Rückenmarks befindet. Ausgehend von dieser innersten Gewebestruktur, ist das Signal ebenfalls in der intermediären Schicht zu finden, wohingegen die kortikale Rückenmarksschicht keine Expression von *Flightless-I* zeigt.

Nach 9 Tagen Bebrütungsdauer, dies entspricht Stadium HH35, ähnelt das embryonale Rückenmark weitestgehend dem adulten. Stark ausgeprägt ist das Signal von *Flightless-I* in der grauen Struktur, wobei ein deutlicher Intensitätsanstieg in den kortikalen Bereichen der rechten und linken dorsalen Wurzel zu verzeichnen ist (Abb. 3.12b, rote Pfeile). Ebenfalls eine stärkere Färbung findet sich ausgehend von den dorsalen Wurzeln in ventromedialer Richtung zum Canalis centralis hin gelegen (Abb. 3.12b, rote Pfeile). Die höchste Expressionsintensität innerhalb der Schmetterlingssubstanz findet sich in der ependymalen Zellschicht, die den Canalis centralis umschließt, welche nur durch eine kleine Aussparung am Dorsalrand unterbrochen wird. Hier entspricht die Expressionsstärke derjenigen in der umgebenden grauen Substanz.

In der weißen Substanz finden sich lediglich vereinzelte Zellen, die *Fli-I* exprimieren. Dagegen sind die das Rückenmark umgebenden Rückenmarkshäute deutlich gefärbt und zeigen ebenso wie die Dorsal- und Ventralwurzel eine starke Expression (Abb. 3.12b).

Abbildung 3.12c veranschaulicht das Expressionsmuster von *Flightless-I* im dorsalen Spinalganglion.

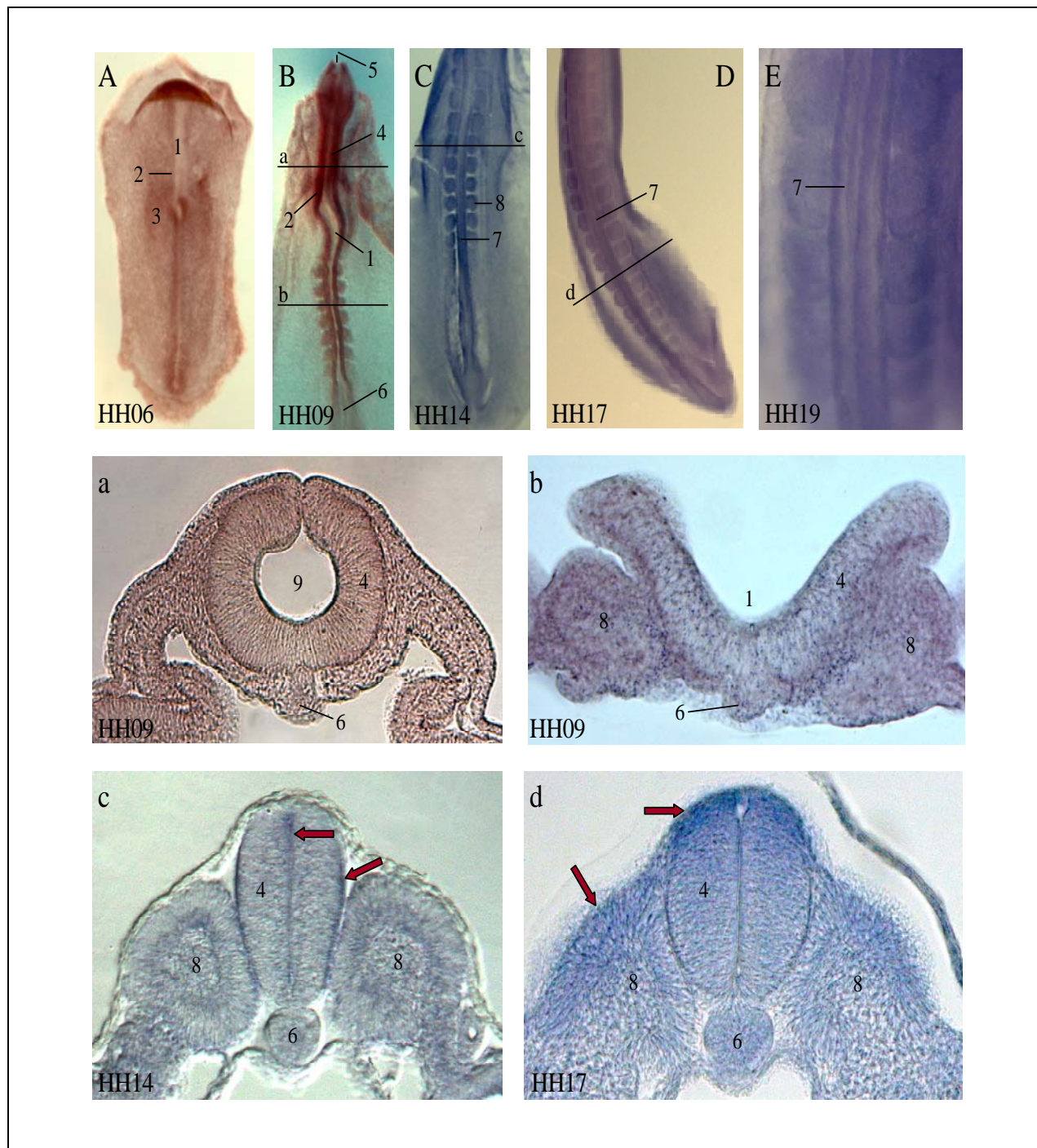


Abb. 3.10 Neuralrohr

A-E: Whole mounts

a-d: Schnitte aus Whole mount-ISH

1 : Neuralrinne

2 : Neuralfalte

3 : Neuralplatte

4 : Neuralrohr

5 : cranialer Neuroporus

6 : Chorda dorsalis

7 : caudaler Teil des Neuralrohres im Bereich der Somiten, der sich zum Rückenmark entwickelt

8 : Somiten

9 : Neuralkanal

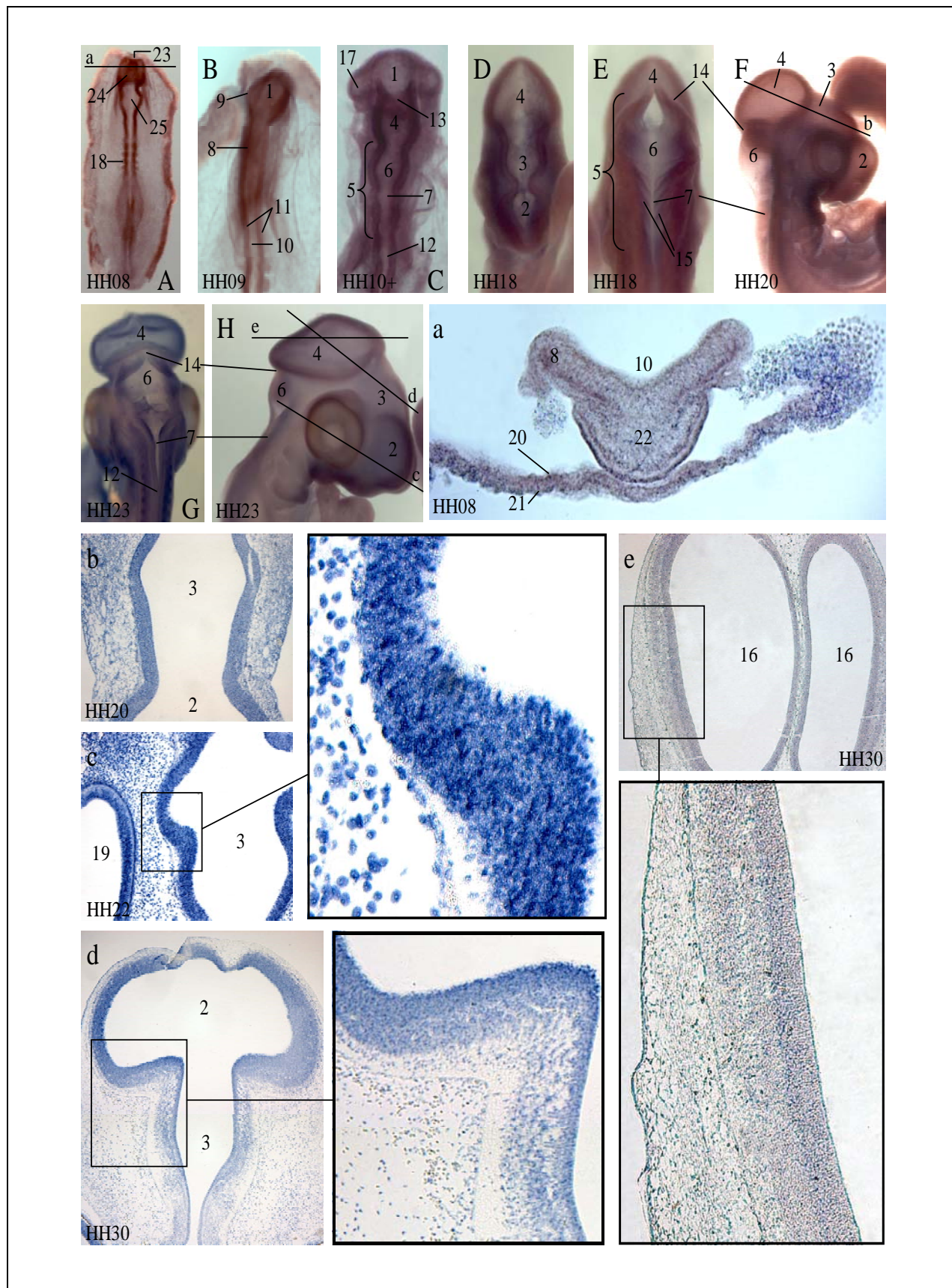
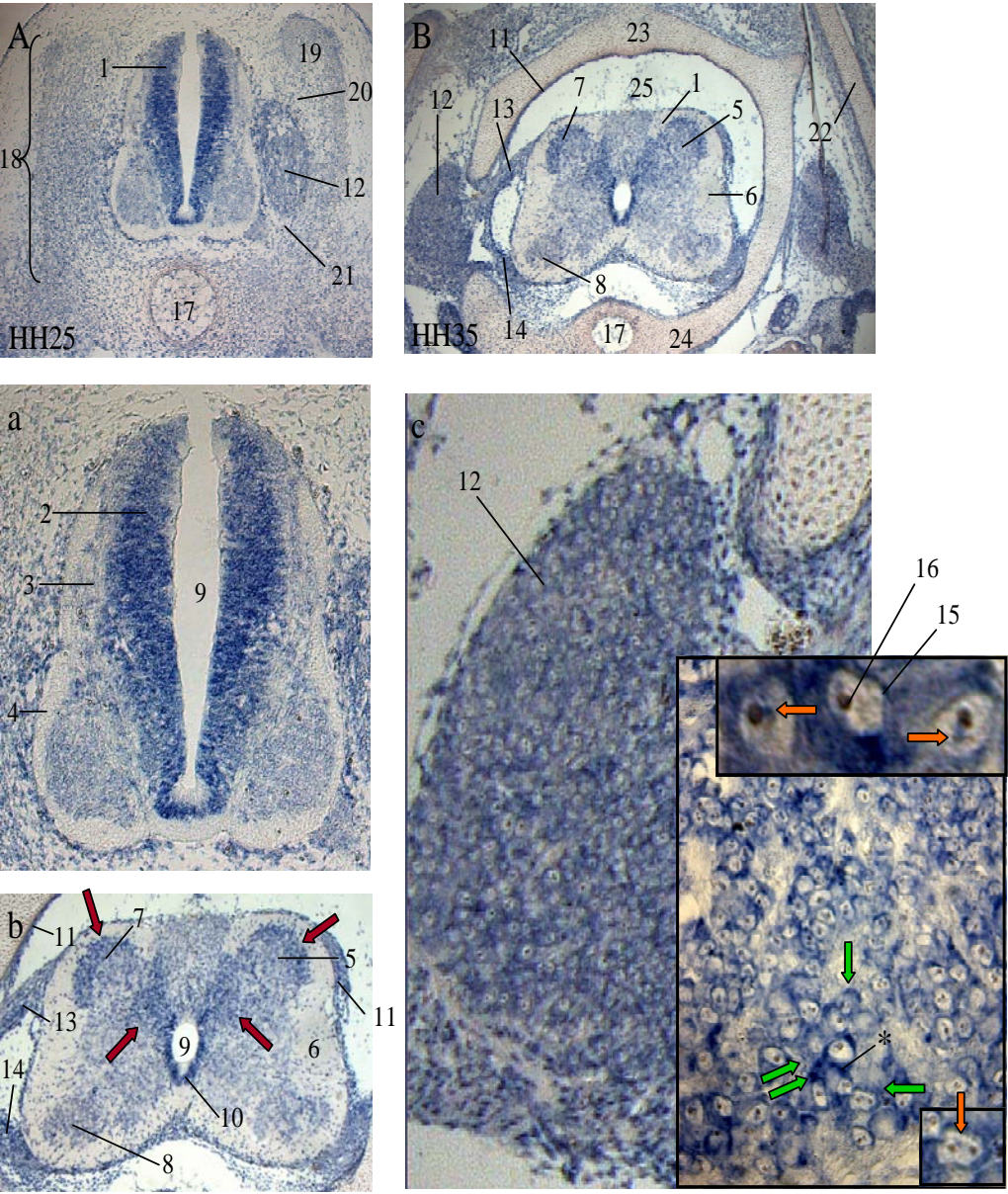


Abb. 3.11 Gehirn



---

<i>A-H</i>	: <i>Whole mounts</i>	<i>12</i>	: <i>Rückenmark</i>
<i>a</i>	: <i>Schnitt aus Whole mount-ISH</i>	<i>13</i>	: <i>Infundibulum</i>
<i>b-e</i>	: <i>Schnitt aus Paraffinschnitt-ISH</i>	<i>14</i>	: <i>Isthmus</i>
<i>1</i>	: <i>Prosencephalon</i>	<i>15</i>	: <i>Rhombomere</i>
<i>2</i>	: <i>Telencephalon</i>	<i>16</i>	: <i>cerebrale Vesikel des Telencephalon</i>
<i>3</i>	: <i>Diencephalon</i>	<i>17</i>	: <i>optisches Vesikel</i>
<i>4</i>	: <i>Mesencephalon</i>	<i>18</i>	: <i>erste Somiten</i>
<i>5</i>	: <i>Rhombencephalon</i>	<i>19</i>	: <i>Auge</i>
<i>6</i>	: <i>Metencephalon</i>	<i>20</i>	: <i>Ektoderm</i>
<i>7</i>	: <i>Myelencephalon</i>	<i>21</i>	: <i>Entoderm</i>
<i>8</i>	: <i>Neuralrohr</i>	<i>22</i>	: <i>Vorderdarm</i>
<i>9</i>	: <i>Ektoderm des Kopfes</i>	<i>23</i>	: <i>cranialer Neuroporus</i>
<i>10</i>	: <i>Neuralrinne</i>	<i>24</i>	: <i>zukünftiges Prosencephalon</i>
<i>11</i>	: <i>Neuralfalte</i>	<i>25</i>	: <i>zukünftiges Mesencephalon</i>



*Abb. 3.12 Rückenmark und Ganglien*

*A u. B und a-c : Schnitte aus  
Paraffinschnitt-ISH*

- 1 : Rückenmark
- 2 : ventrikuläre Schicht des RM
- 3 : intermediäre Schicht des RM
- 4 : randständige Schicht des RM
- 5 : graue Substanz
- 6 : weiße Substanz
- 7 : Dorsalhorn
- 8 : Ventralhorn

- 9 : Zentralkanal
- 10: Ependymzellen
- 11: Rückenmarkshäute
- 12: Spinalganglion
- 13: dorsale Wurzel
- 14: ventrale Wurzel
- 15: Nukleus
- 16: Nukleolus
- 17: Chorda dorsalis
- 18: Somit

19: *Dermotom*20: *Myotom*21: *Sklerotom*22: *Ilium*23: *dorsaler Wirbelbogen*24: *Wirbelkörper*25: *Cavum subdurale*\* : *perinukleärer Zellkörper*

### 3.2.2.3 Somiten und Muskulatur

Mit dem Auftreten des ersten Somitenpaares in Stadium HH07 beginnt auch die Expression von *Flightless-I* in dieser embryonalen Struktur. Anfänglich sind die Somiten homogen gefärbt (siehe Abbildung 3.13a.A). Mit zunehmender Differenzierung verändert sich das Expressionsmuster. In Stadium HH13 (Abb. 3.13a.B) ist deutlich zu erkennen, dass das Zentrum der Somiten sehr viel stärker gefärbt ist als die Peripherie. Eine Signalverstärkung findet sich ebenfalls am äußersten Randbereich jedes einzelnen Somiten (Abb. 3.13a.B, rote Pfeile). Besonders deutlich zeigt sich dies am medialen Rand, parallel des Neuralrohrs.

In den Stadien HH14 und HH17 erscheint das Signal wieder homogen wie in Stadium HH09, bis schließlich in Stadium HH19 eine Signalverstärkung zirkulär unterhalb der Somitenrinde erscheint (Abb. 3.13a.E rote Pfeile).

Nach einer Bebrütungsdauer von drei Tagen, dies entspricht Stadium HH20, nehmen die Somiten eine quadratische Form an. Hier zeichnet sich jetzt eine Erhöhung der Expression von *Fli-I* im Zentrum der Somiten gegenüber der Peripherie ab (Abb. 3.13a.F, roter Pfeil). In Stadium HH24 wird dies noch deutlicher (Abb. 3.13a.G).

Ab Stadium HH25 verändert sich das Expressionsmuster erneut. Die Somiten exprimieren nach wie vor im Ganzen *Flightless-I*, aber es finden sich Konzentrationssteigerungen am cranialen, dorsalen und caudalen Rand der Somiten. Die Expressionssteigerung im Zentrum ist nun nicht mehr kreisförmig auf die Mitte konzentriert, sondern verläuft in dorsoventraler Richtung in einem schmalen Streifen entlang der Somitenmitte (Abb. 3.13a.H-J).

Im Querschnitt durch einen Embryo Stadium HH09 (Abb. 3.13b.a) lässt sich erkennen, dass die Somiten als Ganzes das Signal von *Flightless-I* exprimieren. Im linken Somiten ist zusätzlich zu sehen, dass sich eine leichte Signalverstärkung an der Grenze zwischen Somitocoel und Somitenepithel abzeichnet (roter Pfeil). In Stadium HH13 zeigen sich Somitocoel und Somitenepithel gleichmäßig gefärbt (Abb. 3.13b.b).

Mit der fortschreitenden Reifung der Somiten öffnen diese sich nach ventral und bilden von dorsal nach ventral Dermomyotom, Myotom und Sklerotom aus. In Abbildung 3.13b.c wird sichtbar, dass alle drei Strukturen *Flightless-I* exprimieren. Am ventralen Rand des Dermomyotoms allerdings, zeigt sich an der Grenze zum Myotom eine drastische

Signalerhöhung gegenüber den umliegenden Strukturen. Am rechten Somiten lässt sich erkennen, dass diese Signalverstärkung sich auch am dorsalen Rand des Myotoms findet (siehe roter Pfeil).

In Stadium HH17 zeichnet sich das Dermomyotom in seiner Expression deutlich von den umliegenden Geweben ab. Nach wie vor ist das Signal in allen bis dahin entwickelten Organen zu finden, aber die stärkste Färbung zeigt sich dennoch im Dermomyotom (Abb. 3.13b.d). Hierbei erhöht sich die Signalstärke am dorsalen Rand und noch viel stärker an der ventralen Begrenzung des Dermomyotoms. In der Vergrößerung ist zu sehen, dass die Expression in der ventralen Dermomyotomlippe abnimmt und in der Intensität der Färbung dem umliegenden Sklerotom gleicht.

Darüber hinaus ist zu bemerken, dass, wie bereits in Abschnitt 3.2.2.2 „Neuralrohr“ beschrieben, sich weitere Signalverstärkungen am dorsalen Rand des Neuralrohres und auch an den Dorsalrändern der Extremitätenleisten befinden (Abb. 3.13b.d).

Nach 5 Tagen Bebrütungszeit in Stadium HH25 (Abb. 3.13b.e) zeigt sich in der gut entwickelten dorsalen Lippe des Dermomyotoms, am äußersten Rand der Lippe, eine klare Abschwächung des Signals.

Die Expression von *Flightless-I* bleibt keineswegs nur auf die Somiten beschränkt, sondern findet ebenso ihren Fortgang in den hypaxialen Muskelstrukturen, sowie in der autochthonen Rückenmuskulatur (hier dargestellt in Abbildung 3.13b.f an einem Stadium HH30). In späteren Stadien zeigt der nun deutlich differenziertere Skelettmuskel ebenfalls das Signal von *Fli-I* (Abb. 3.13b.g).

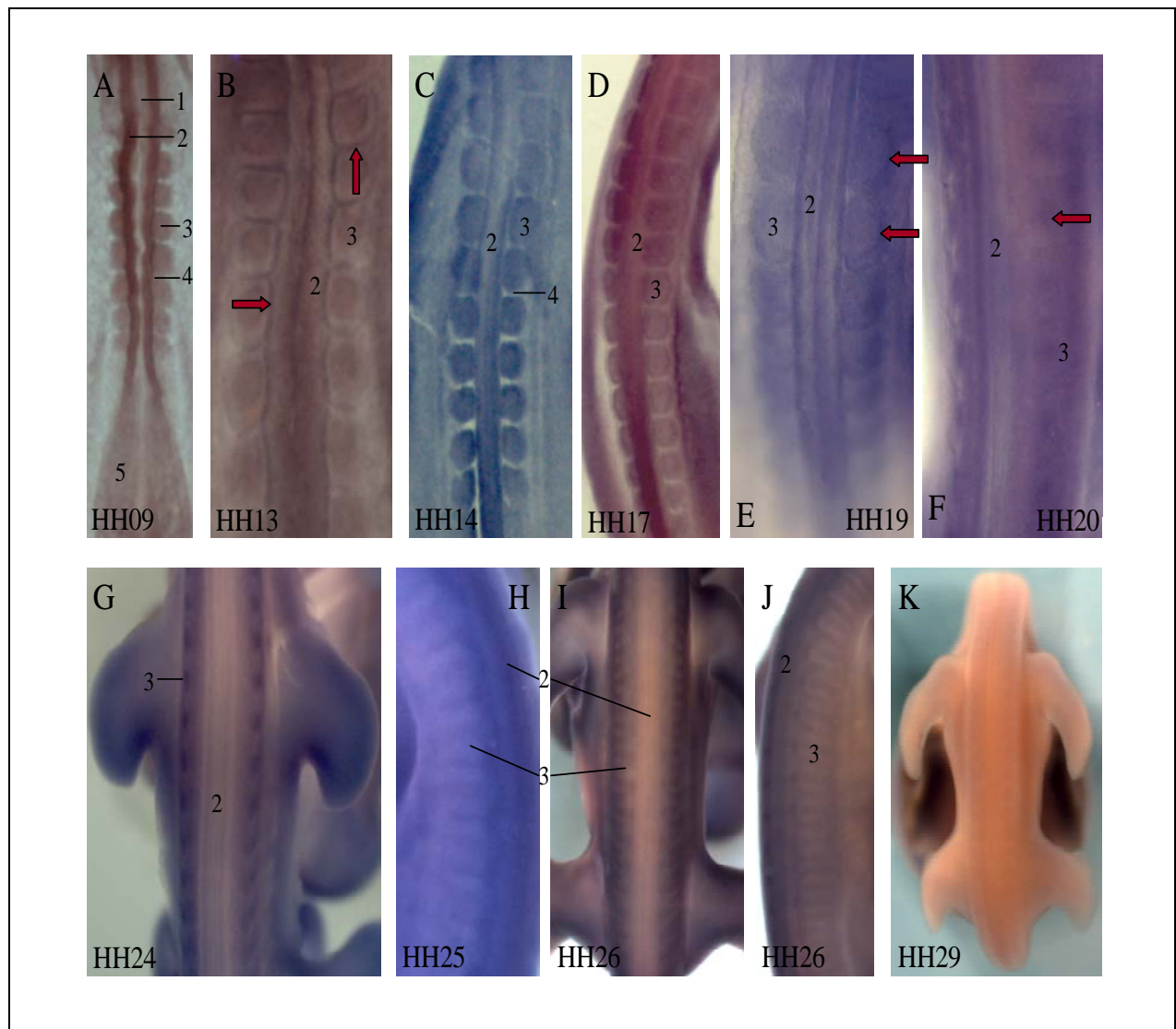


Abb. 3.13a Somiten

A-J : Whole mounts, Antisense-Probe

K : Whole mount, Sense-Probe

1 : Notochord

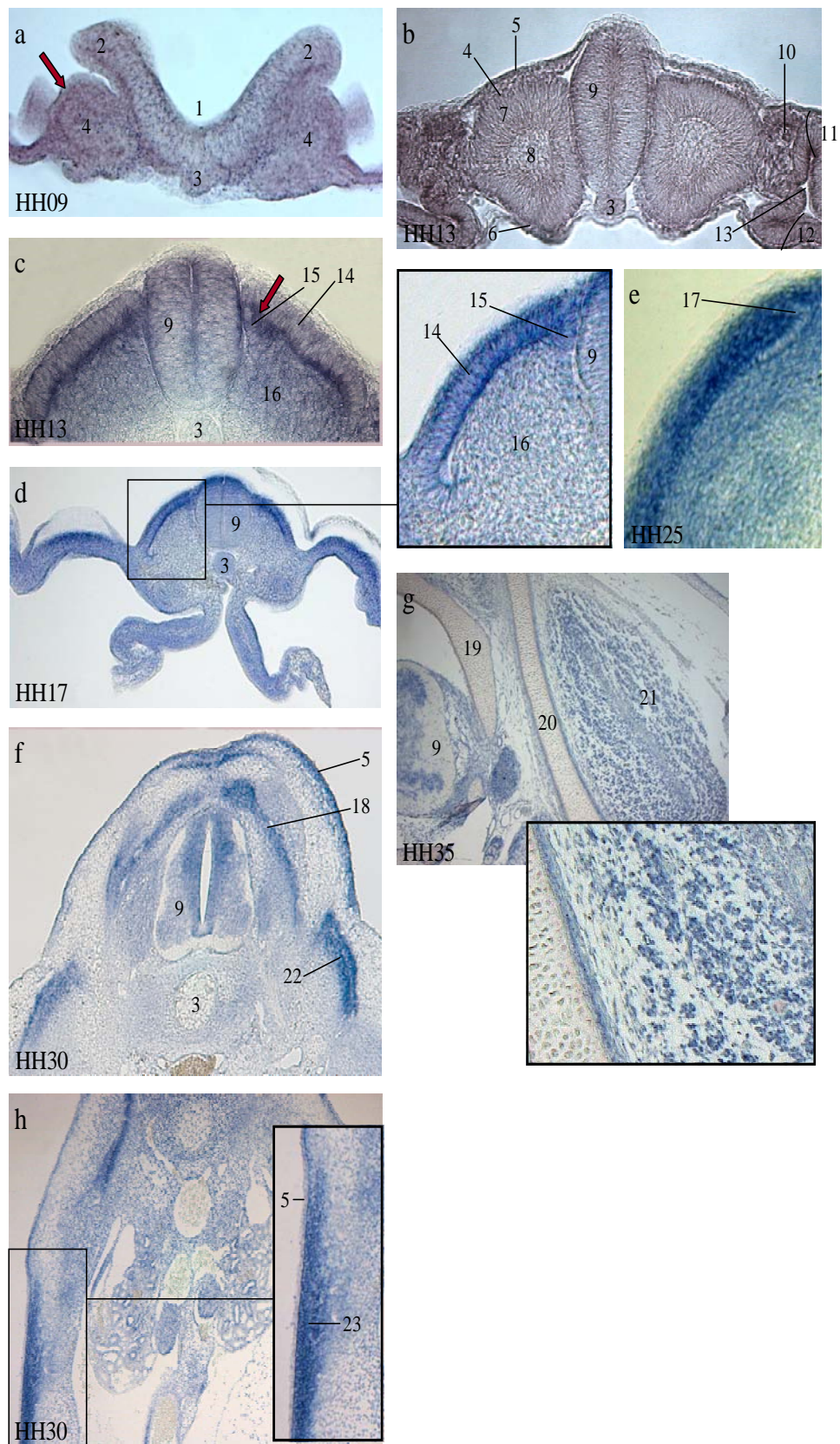
2 : Neuralfalte bzw. Rückenmark

3 : Somiten

4 : intersomitischer Zwischenraum

5 : Neuralplatte





*Abb. 3.13b Muskulatur*

<i>a-c : Schnitte aus Whole mount-ISH</i>	<i>13 : intraembryonales Coelom</i>
<i>d-h : Schnitte aus Paraffinschnitt-ISH</i>	<i>14 : Dermatom</i>
<i>1 : Neuralrinne</i>	<i>15 : Myotom</i>
<i>2 : Neuralfalte</i>	<i>16 : Sklerotom</i>
<i>3 : Chorda dorsalis</i>	<i>17 : dorsomediale Lippe des Dermomyotoms</i>
<i>4 : Somiten</i>	<i>18 : Myotom des Somiten = autochthone Rückenmuskulatur</i>
<i>5 : Ektoderm</i>	<i>19 : Wirbelbogen</i>
<i>6 : Entoderm</i>	<i>20 : Ilium</i>
<i>7 : Somitenepithel</i>	<i>21 : M. iliotrochantericus cranialis</i>
<i>8 : Somatocoel</i>	<i>22 : Hypaxiale Muskulatur</i>
<i>9 : Rückenmark</i>	<i>23 : Dermis</i>
<i>10 : intermediäres Mesoderm</i>	
<i>11 : Somatopleura</i>	
<i>12 : Splanchnopleura</i>	

**3.2.2.4 Knorpel und Chorda dorsalis*****Knorpel***

In den „Whole mounts“ älterer Stadien (hier Stadien HH31 u. 33, Abb. 3.14.A-C) zeichnet sich, bei entsprechender Ausleuchtung, bereits das Knorpelskelett des Embryos ab. Die Expression von *Flightless-I* ist deutlich parallel der noch knorpeligen Digiti zu finden. Dies ist sowohl auf dorsalen als auch auf palmaren und plantaren Flächen gut zu erkennen.

Querschnitte durch die Stadien HH30-35 bestätigen die Erkenntnisse der „Whole mounts“. In den Abbildungen 3.14.a-d zeigt sich, dass sämtliche Knorpelstrukturen *Flightless-I* exprimieren. Dabei auffallend ist, dass das Signal besonders stark in jungem Knorpel exprimiert wird. Je weiter distal der Schnitt erfolgt, desto stärker und homogener die Färbung. Proximalwärts, wo der Knorpel dicker und im Zuge der Entwicklung auch reifer wird, schwindet das Signal von *Flightless-I* zunehmend aus dem Zentrum der Digiti, bis es schließlich im reiferen Knorpelskelett fast nur noch auf einen peripheren Randbereich begrenzt ist.

In Stadium HH35 zeigt sich in Oberschenkel- und Beckenskelett deutlich, wie im reiferen, differenzierteren Knorpel zusehends die Expression von *Flightless-I* schwindet und sich auf die periostalen Bereiche zurückzieht (Abb. 3.14.d-f).

***Chorda dorsalis***

Die Chorda dorsalis, als axiales Innenskelett der Wirbeltiere und vorläufige Stütze des Embryos entlang der Längsachse, zeigt von Beginn an eine Expression von *Flightless-I*. In den kleineren und mittleren Stadien ist die Chorda dorsalis homogen gefärbt (Abb. 3.15.a-c).

Mit zunehmender Differenzierung des Gewebes spezifiziert sich auch die Expression auf bestimmte Strukturen der Chordazellen. Es zeigt sich nunmehr keine homogene Färbung der Chorda dorsalis. Das Bild wechselt vielmehr zwischen deutlich das Signal exprimierenden Strukturen und signalfreien Vakuolen (Abb. 3.15.d u. e).

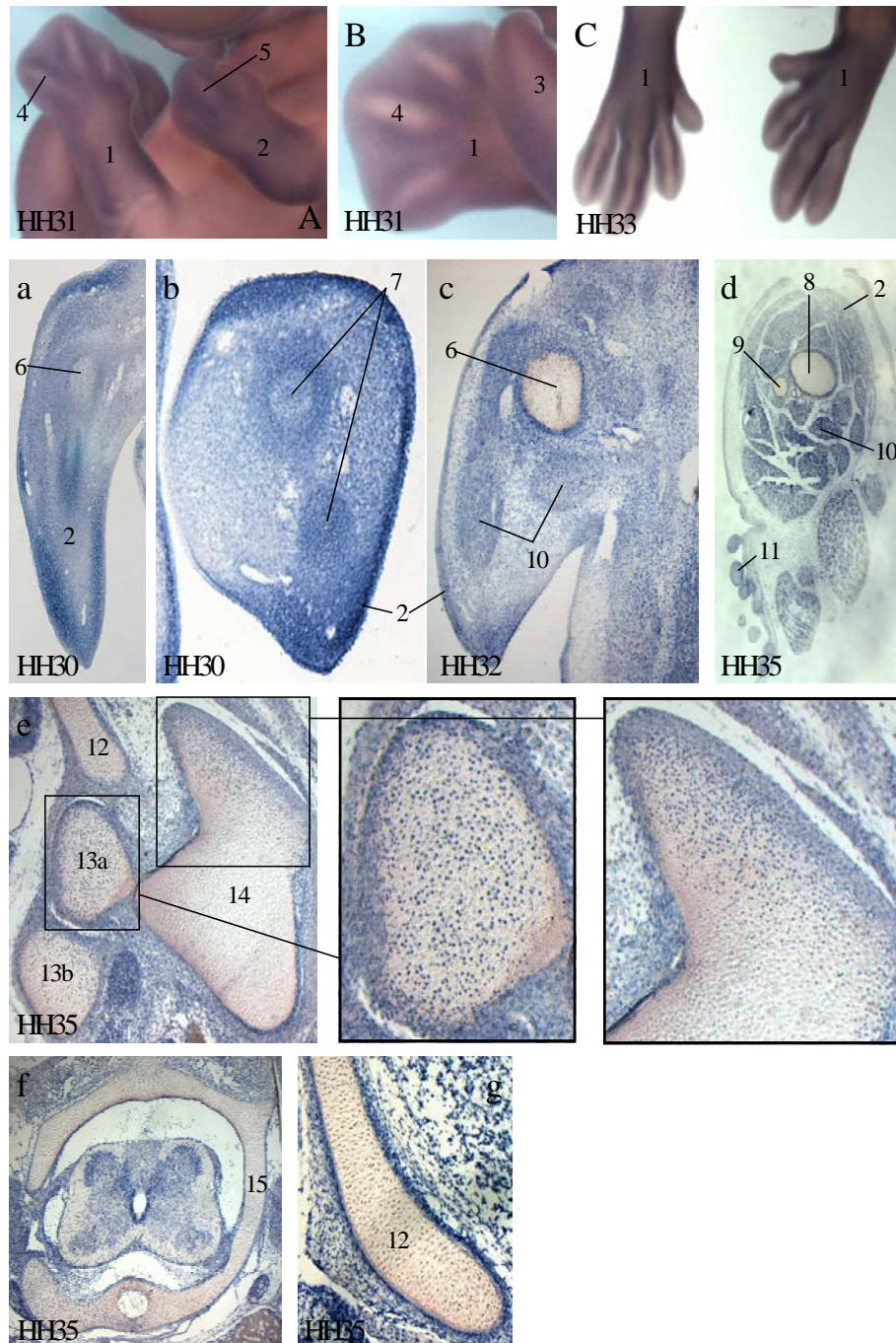


Abb. 3.14 Knorpel



A-C : Whole mounts

a-g : Schnitte aus Paraffinschnitt-ISH

1 = Bein

2 = Flügel

3 = Schwanz

4 = Zehe

5 = Finger

6 = knorpeliger Humerus

7 = Cartilagine manus

8 = knorpelige Ulna

9 = knorpeliger Radius

10 = Muskulatur

11 = Federknospen

12 = knorpeliges Os Ilium

13a = knorpeliges Os ischii

13b = knorpeliges Os pubis

14 = knorpeliger Femur

15 = knorpeliger Wirbel

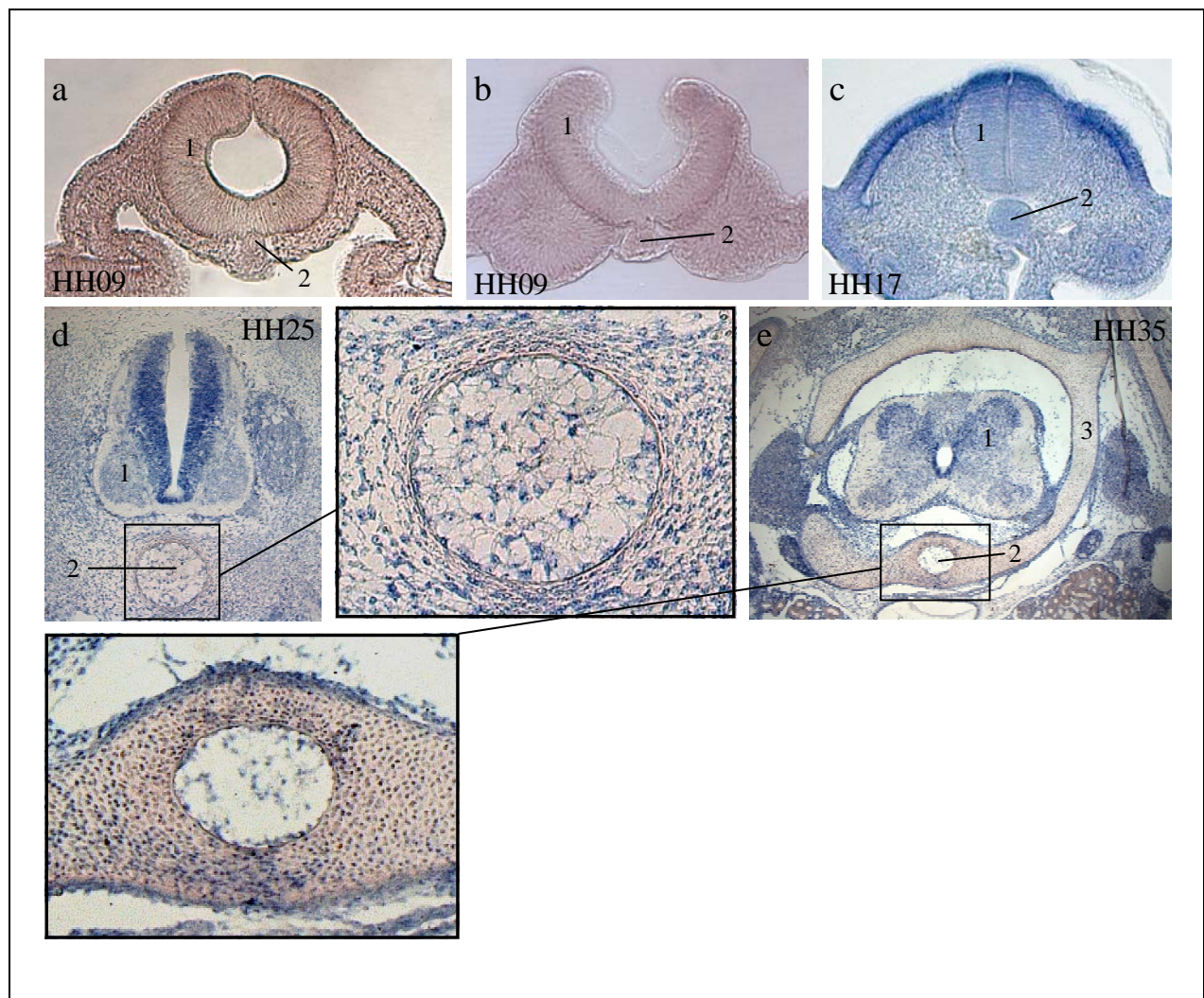


Abb. 3.15 Chorda dorsalis

a-c: Schnitte aus Whole mount-ISH

d-e: Schnitte aus Paraffinschnitt-ISH

1 = Neuralrohr bzw. Rückenmark

2 = Chorda dorsalis

3 = Wirbel

### 3.2.2.5 Haut und Federn

In den frühen Stadien der Entwicklung zeigt sich das Signal, wie bereits in Kapitel 3.2.2.3 „Somiten und Muskulatur“ beschrieben, in den Somiten und somit auch in Anteilen von Vorläuferstrukturen der zukünftigen Haut.

Über die einzelnen Stadien hinweg wird *Flightless-I* permanent in der Dermis und teilweise auch in Epidermis und Subkutis exprimiert und erfährt nur in den älteren Stadien, wie hier Stadium HH36 (Abb. 3.16.G-I und r-s), eine leichte Abschwächung, um dann umso stärker in den entstehenden Federknospen hervorzutreten. Hier gezeigt in den Abbildungen 3.16.G-I.

Im Querschnitt durch Stadium HH06 (Abb. 3.16.a) wird deutlich, dass *Flightless-I* im Mesoderm exprimiert wird, aus dem später die Somiten hervorgehen. Während der Entwicklung findet sich das Signal zunächst auch in der äußersten Körperhülle, dem Ektoderm. Dies kann bis Stadium HH12 verfolgt werden, was einer Bebrütungsdauer von 45-49 Stunden entspricht. Ab dem Stadium HH13 verschwindet das Signal von *Flightless-I* schließlich vollständig aus dem Ektoderm (siehe Abb. 3.16.e-h) und wird erst wieder ab Stadium HH30 in Teilen des Körpers und der Extremitäten in dieser Struktur exprimiert (Abb. 3.16.n-s).

Nach der Öffnung der Somiten und Ausbildung von Dermotom, Myotom und Sklerotom ist deutlich zu erkennen, wie *Flightless-I* im Dermatome und besonders stark an dessen ventralem Rand exprimiert wird (Abb. 3.16.f und h).

In Stadium HH17 lässt sich ebenfalls diese Expressionsverstärkung am ventralen Rand des Dermomyotoms erkennen und es zeigt sich zusätzlich eine starke Expression in den entstehenden Myotomzellen (Abb. 3.16.i).

Nach 5 Tagen Bebrütungszeit, in Stadium HH25, erscheint das Dermomyotom deutlich gefärbt, wobei es zu einer Expressionssteigerung im dorsomedialen Bereich kommt und sich dann am äußersten Randbereich, in der sogenannten dorsomedialen Lippe, wieder verliert. Auf diese Weise entsteht an dieser Stelle eine deutliche Aussparung des Signals (Abb. 3.16.j).

Die Expression von *Flightless-I* in den Extremitäten ergibt zunächst eine homogene Färbung in den kleinen und mittleren Stadien. Jedoch beginnt sich das Bild in den älteren Embryonen drastisch zu wandeln. Eine Expression ist nach wie vor in allen Geweben der Extremitäten zu erkennen, aber es zeigt sich deutlich eine Erhöhung der Expression in bestimmten Arealen. Es ist stets eine Signalverstärkung in den dorsolateralen und apikalen Bezirken der Flügel und Beine zu sehen. In der Vergrößerung von Abbildung 3.16.m ist entlang der Dermis eine scharf gefärbte Linie zu erkennen, von der aus sich die Expression dorsal und apikal teilweise ein Stück weit in die Dermis hinein Richtung zukünftiger Subkutis zieht, während das Ektoderm bis auf den Bereich der apikalen Wachstumszone ungefärbt bleibt. Dieses Bild der Expression

zeigt sich ebenfalls an der Lateralseite des Rumpfes und der wachsenden Extremitäten genau wie dorsolateral oberhalb des Neuralrohres (Abb. 3.16.o und p).

In Stadium HH35 schließlich findet sich in der Epidermis ein ausgeprägtes Signal von *Flightless-I*, das sich ebenso auf die Federknospen erstreckt (Abb. 3.16.g). Mit fortschreitender Differenzierung der Federanlagen zeigt sich eine klare Verstärkung der Expression an der Grenze zwischen der Papille und verdickter Epidermis (Abb. 3.16.s).

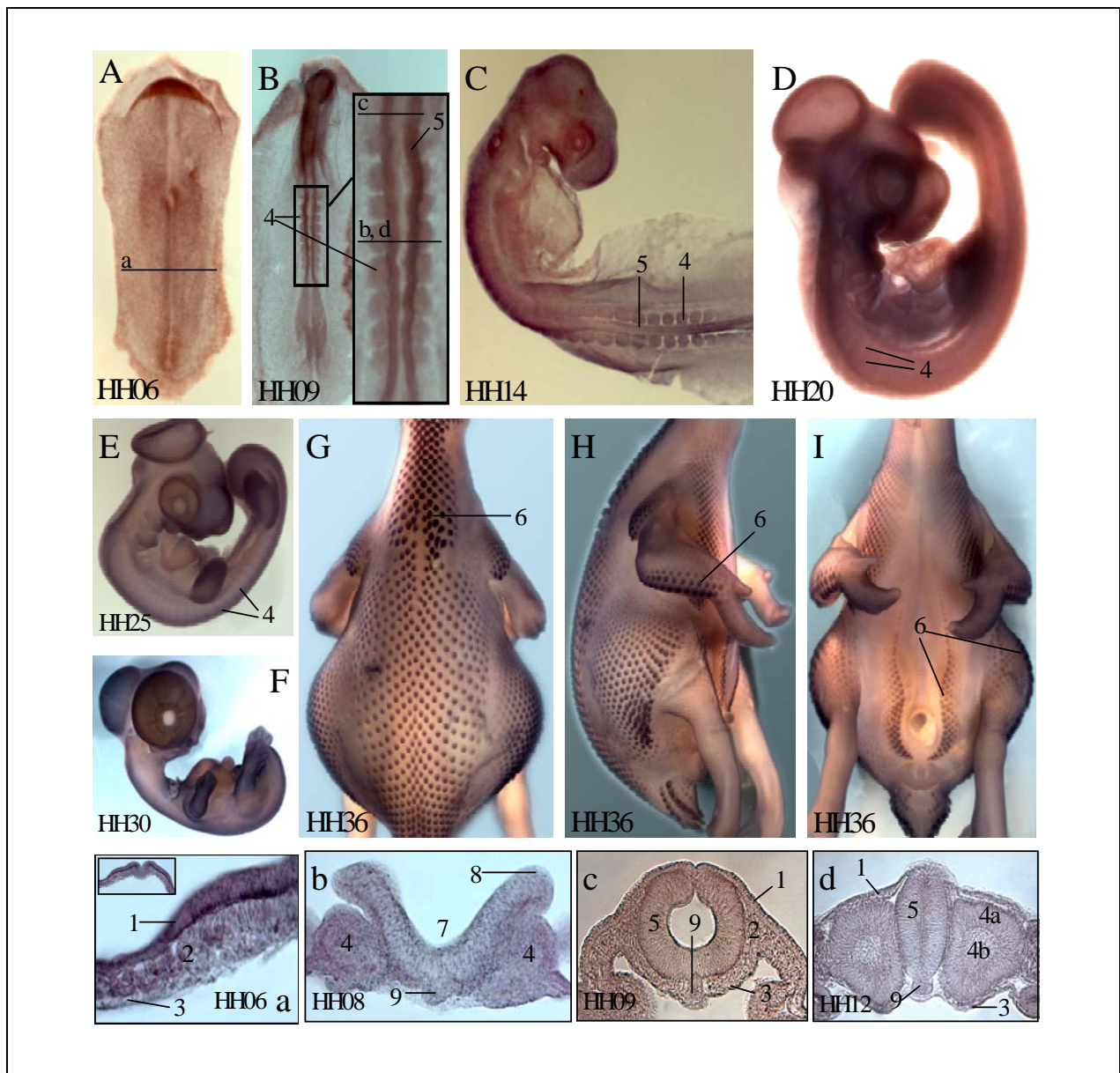


Abb. 3.16 Haut und Federn  
Legende zur Abb. s. S. 79.



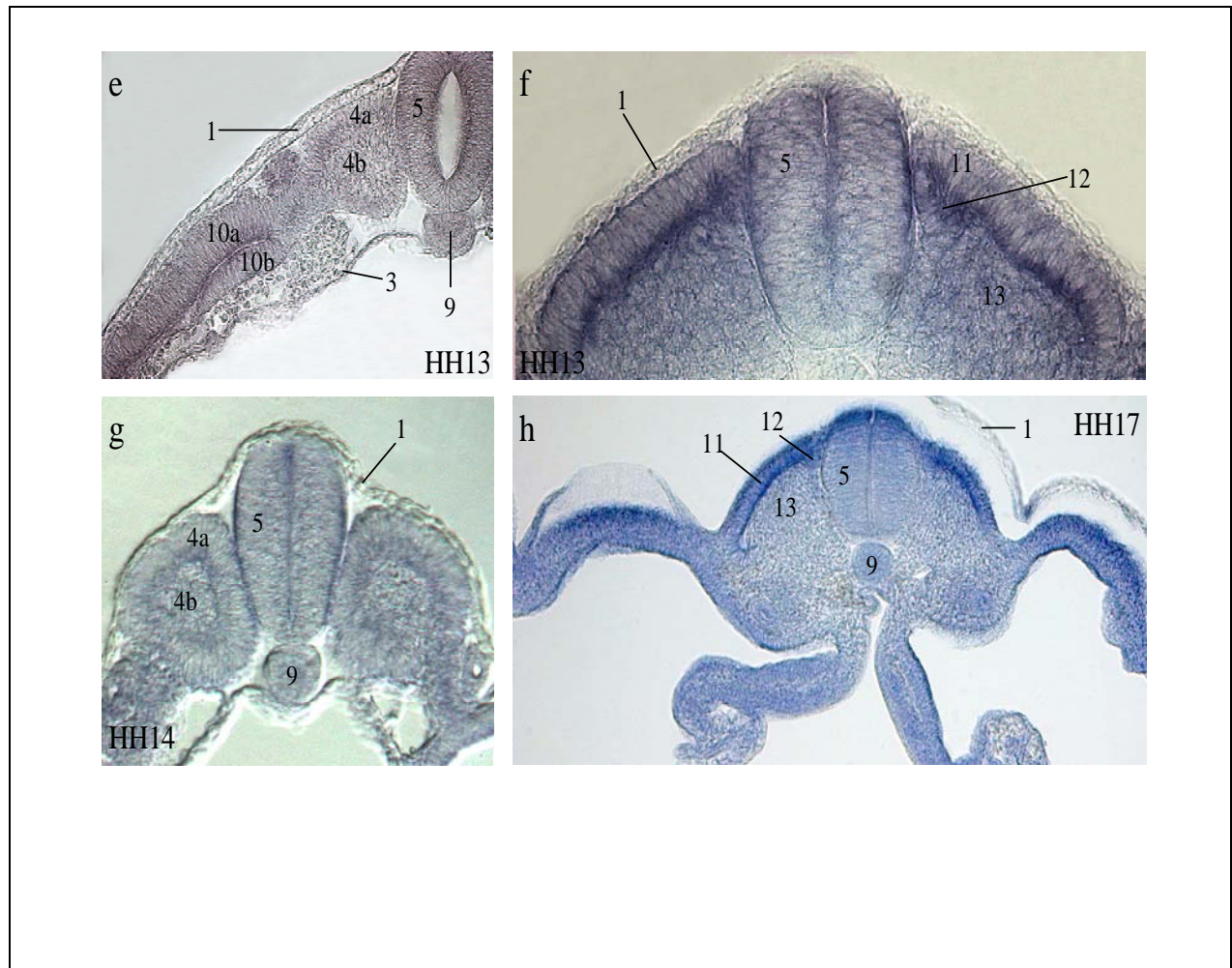


Abb. 3.16 Haut und Federn  
Legende zur Abb. s. S. 79.

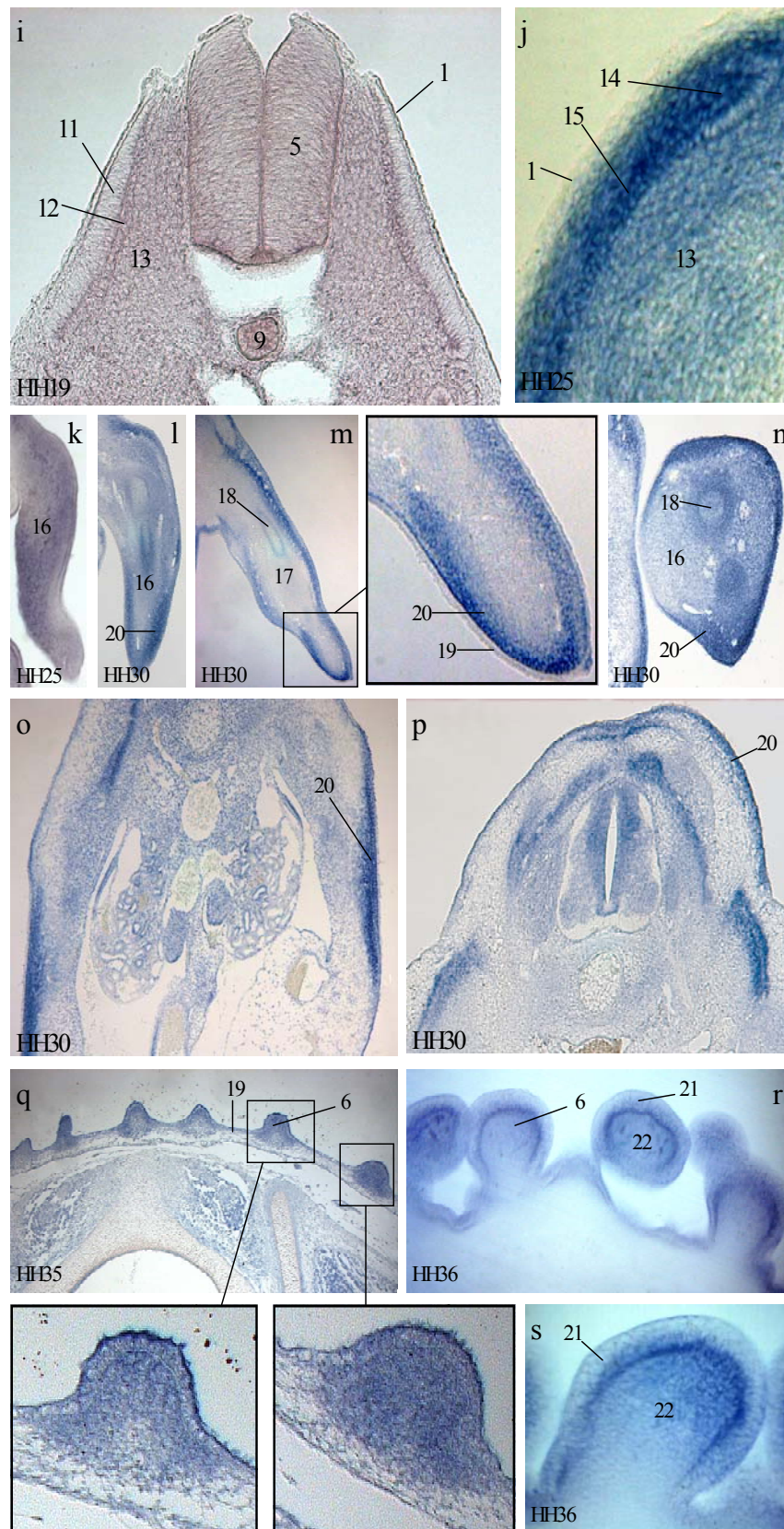




Abb. 3.16 *Haut und Federn*

<i>A-I</i> :	<i>Whole mounts</i>	10	=	<i>Seitenplattenmesoderm; Somatopleura (10a), Splanchnopleura (10b)</i>
<i>a-s</i> :	<i>Schnitte</i>	11	=	<i>Dermatom</i>
<i>a-j</i> :	<i>Schnitte aus Whole mount-ISH</i>	12	=	<i>Myotom</i>
<i>k-s</i> :	<i>Schnitte aus Paraffinschnitt-ISH</i>	13	=	<i>Sklerotom</i>
1	=	14	=	<i>dorsomediale Lippe des Dermomyotoms (an dieser Stelle Aussparung des Signals von Flightless-I)</i>
2	=	15	=	<i>Dermomyotom</i>
3	=	16	=	<i>Flügel</i>
4	=	17	=	<i>Bein</i>
5	=	18	=	<i>Knorpel</i>
6	=	19	=	<i>Epidermis</i>
7	=	20	=	<i>Dermis</i>
8	=	21	=	<i>verdickte Epidermis</i>
9	=	22	=	<i>Dermale Papille</i>

### 3.2.2.6 Auge

Die Abbildungen 3.17.A-I zeigen in den Stadien HH10-36 das Expressionsmuster von *Flightless-I* im sich entwickelnden Auge.

Zunächst ist lediglich die primitive Augenblase mit dem Signal von *Fli-I* zu sehen, die sich jedoch rasch zum sogenannten Augenbecher entwickelt (Abb. 3.17.B), bis sich schließlich das Auge zu komplexeren Strukturen differenziert und nicht nur der Augenbecher das Signal exprimiert, sondern auch die Linse (Abb. 3.17.C).

Da das Auge sich im Laufe der Entwicklung zu einem kompakten, mehrschichtigen Organ entwickelt, war es nicht mehr möglich, aufgrund von „Whole mounts“, exakte Aussagen über die Expression von *Flightless-I* zu machen. In den Abbildungen 3.17.a-e sind deshalb zur genaueren Analyse Querschnitte durch das Auge gezeigt.

In Stadium HH19 (Abb. 3.17.a) exprimieren sowohl der Augenbecher, mit seinen beiden Schichten Retina und Pigmentschicht, das Signal von *Flightless-I* als auch die Linse. Die Paraffinschnitt-In-situ-Hybridisierung in Stadium HH20 (Abb. 3.17.b) lässt erkennen, dass die Zellen von Retina und Pigmentschicht als Ganzes *Flightless-I* exprimieren. Die Linsenfasern zeigen nur ein schwaches Signal von *Fli-I*, während die Zellen im vorderen Linsenepithel und in der hinteren Linsenfläche sehr deutlich das Signal exprimieren. Schön dargestellt ist in Abbildung 3.17.b die Expression im Nervus opticus auf seinem Weg zum Diencephalon.

Im sich entwickelnden Auge bleibt das Signal in Retina, Pigmentschicht und Iris erhalten, wohingegen die Expression in den Linsenfasern und in den Zellen der hinteren Linsenfläche zunehmend schwächer wird und sich in der Hauptsache nunmehr auf das vordere Linsenepithel konzentriert. Auch in Kornea und Sklera wird *Flightless-I* exprimiert (Abb. 3.17.d).

Das Gewebe zwischen Auge und Diencephalon, das sogenannte Kopfmesenchym, zeigt ebenfalls das Signal von *Flightless-I* (Abb. 3.17.e).

Mit dem Stadium HH30 verschwindet schließlich die Expression in der Pigmentschicht und diese stellt sich nun als braun gefärbte, scharfe Linie dar (Abb. 3.17.e).

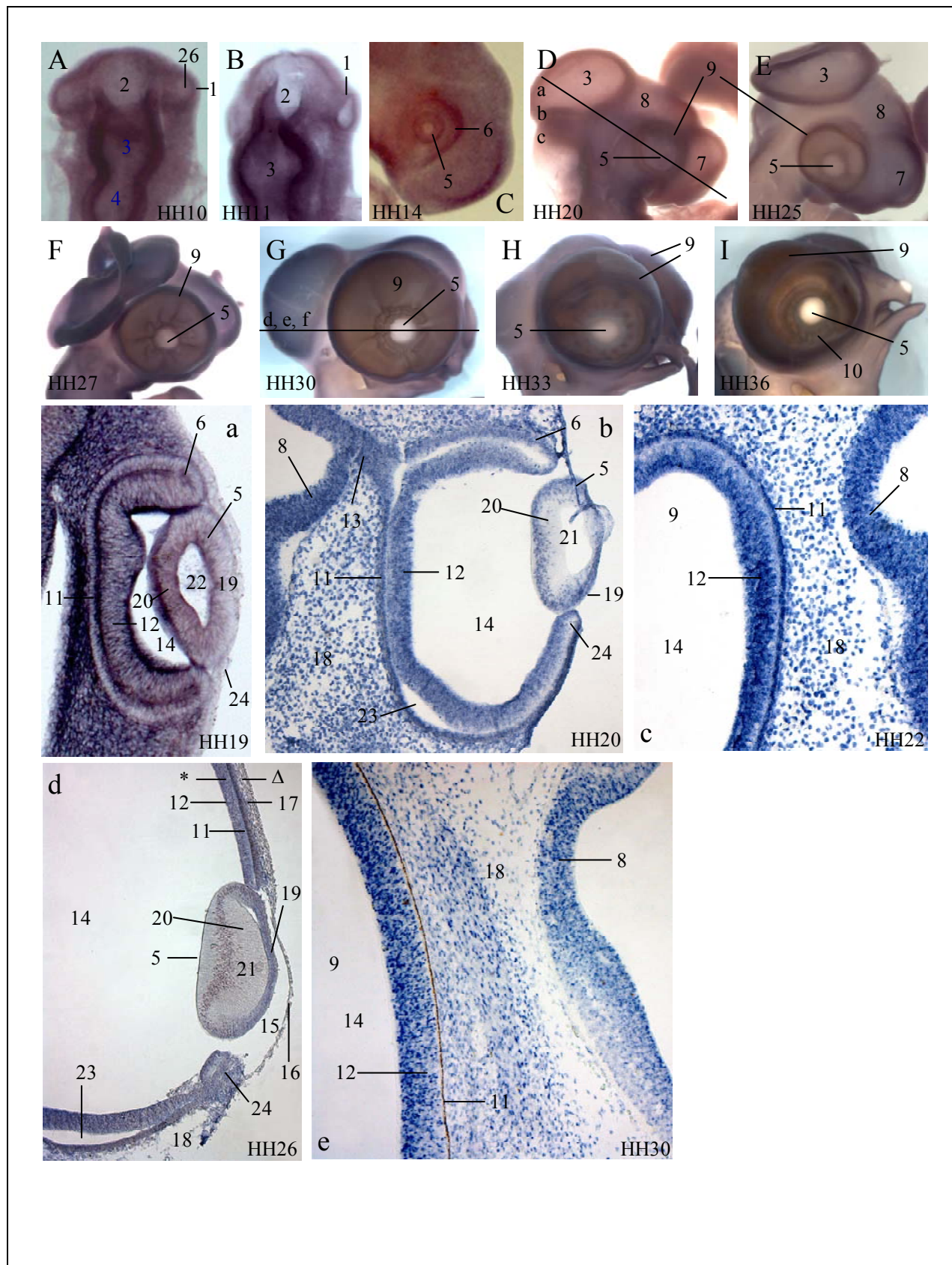


Abb. 3.17 Auge

A-I : Whole mounts

a-e : Schnitte

<i>a</i> :	<i>Schnitt aus Whole mount-ISH</i>	
<i>b-e</i> :	<i>Schnitte aus Paraffinschnitt-ISH</i>	
1	= <i>Augenbläschen</i>	12 = <i>Retina (sensorische Retina)</i>
2	= <i>Prosencephalon</i>	13 = <i>Sehnerv</i>
3	= <i>Mesencephalon</i>	14 = <i>Glaskörper</i>
4	= <i>Rhombencephalon</i>	15 = <i>vordere Augenkammer</i>
5	= <i>Linse</i>	16 = <i>Kornea</i>
6	= <i>Augenbecher</i>	17 = <i>Sklera</i>
7	= <i>Telencephalon</i>	18 = <i>Kopfmesenchym</i>
8	= <i>Diencephalon</i>	19 = <i>vorderes Linsenepithel</i>
9	= <i>Auge</i>	20 = <i>Linsenfasern</i>
10	= <i>Iris</i>	21 = <i>Linsenkörper</i>
11	= <i>Pigmentschicht (pigmentierte Retina)</i>	22 = <i>Hohlraum des Linsenbläschens</i>
		23 = <i>intraretinaler Zwischenraum</i>
		24 = <i>Reste der ventralen Iris</i>
		* = <i>innere Randschicht</i>
		$\Delta$ = <i>äußere Mantelschicht</i>

### 3.2.2.7 Ohr und Pharyngealbögen

#### *Ohr*

In den Abbildungen 3.18.A-I sind Embryonen der Stadien HH14-36 dargestellt.

In den Stadien HH14-23 (Abb. 3.18.A-D) ist deutlich die Expression von *Flightless-I* im Ohrbläschen zu sehen. Zusätzlich erlaubt Abbildung 3.18.B einen Blick auf den ebenfalls *Fli-I* exprimierenden Endolymphatischen Gang des Ohrbläschens. Darüber hinaus lässt sich ein klares Signal von *Flightless-I* im Akustiko-Facialis-Ganglion erkennen (Abb. 3.18.B u. D).

Im Laufe der Entwicklung verändert sich das Ohrbläschen zu einer kleinen, leicht erhabenen, kraterförmigen Struktur, in der sich das Signal bis hin zu den großen Entwicklungsstadien, in denen das Ohr schließlich der Ohröffnung des adulten Hühnchens ähnelt, verfolgen lässt (Abb. 3.18.G-I).



Abb. 3.18 Ohr

A-I: Whole mount

1: Ohrbläschen bzw. Ohr

2: Endolymphatischer Gang des Ohrbläschens

3: Akustiko-Facialis-Ganglion

### Pharyngealbögen

Durch Wucherungen des Mesenchyms im Kopfdarmbereich entstehen die Pharyngealbögen. Als Anlage für zukünftige Strukturen wie Kiefer, Gehörknöchelchen, Zungenbein und Kehlkopf sind sie unerlässlich.

In den Abbildungen 3.19.A-D ist gezeigt, wie in den unterschiedlichen Stadien alle vier Pharyngealbögen das Signal von *Flightless-I* homogen exprimieren.

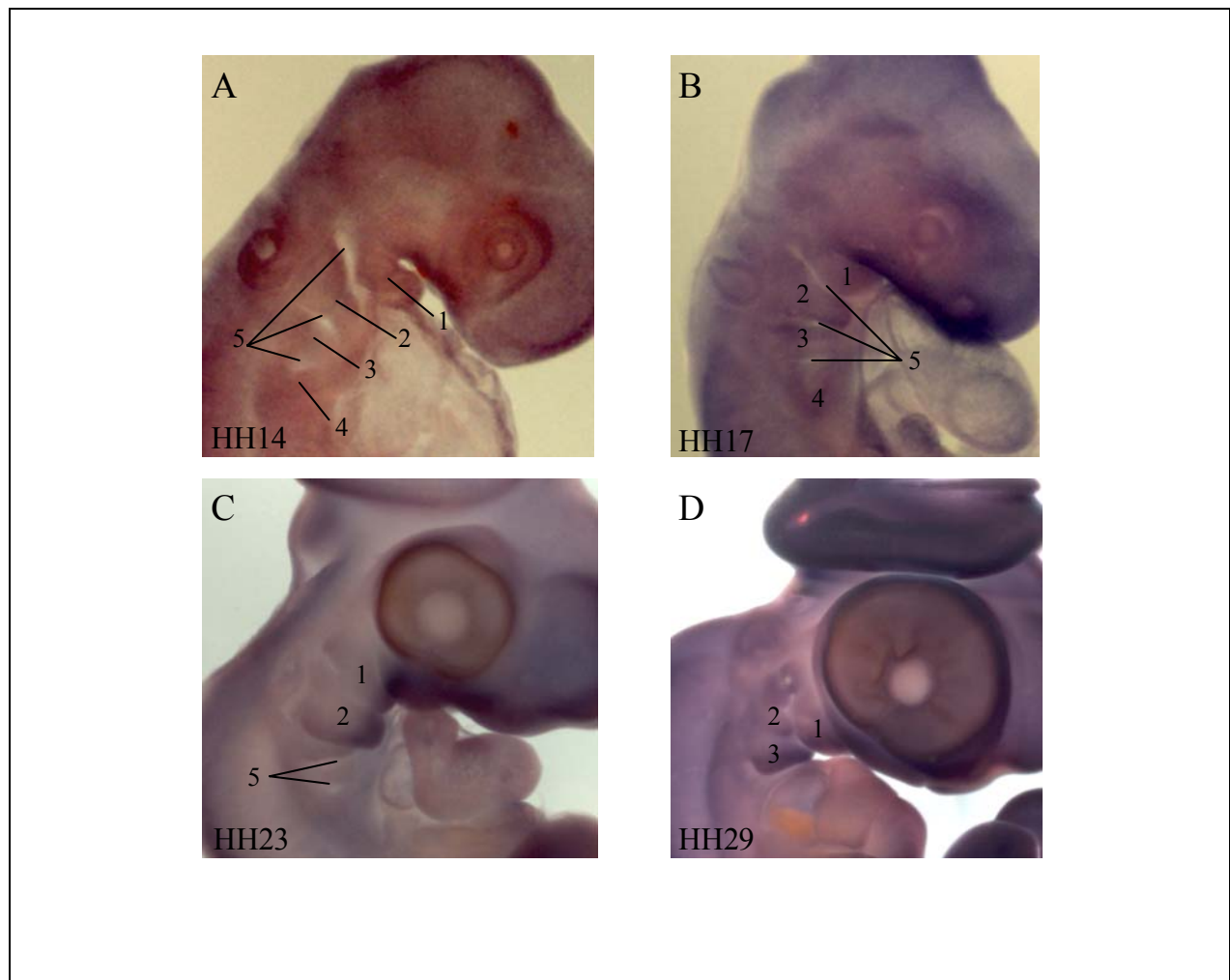


Abb. 3.19 Pharyngealbögen  
A-D: Whole mounts

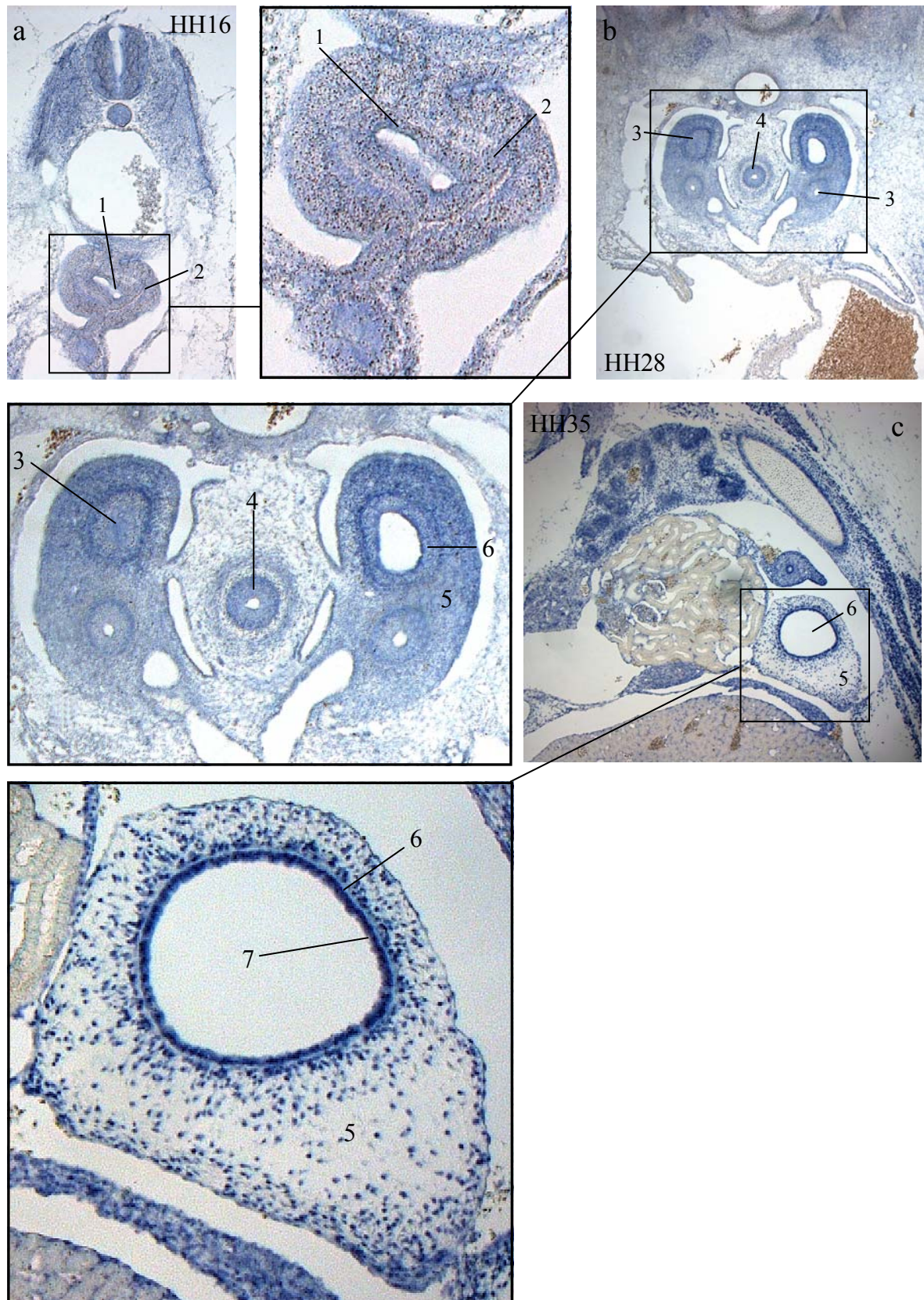
- 1 = 1. Pharyngealbogen
- 2 = 2. Pharyngealbogen
- 3 = 3. Pharyngealbogen
- 4 = 4. Pharyngealbogen
- 5 = Schlundfurchen

### 3.2.2.8 Lunge

Schon mit Beginn der Lungenknospung zeigt sich eine Expression von *Flightless-I* in diesem Organ (Abb. 3.20.a). Im heranwachsenden Lungengewebe wird *Flightless-I* homogen exprimiert. Zu einer deutlichen Intensitätssteigerung kommt es im Bereich der Bronchien, an der dem Lumen zugewandten Seite sowie an der Grenze zwischen Bronchus und dem übrigen Lungengewebe (Abb. 3.20.b).

Nach 9 Tagen Bebrütungszeit, in Stadium HH35, sind bereits die einzelnen Zellen im Lungengewebe zu erkennen. Eine starke Expression von *Flightless-I* findet sich im einschichtigen Plattenepithel der Bronchien. Die übrigen Lungenzellen zeigen das gleiche Expressionsmuster für *Flightless-I*. Dabei fällt auf, dass deutlich mehr Lungenzellen im direkten Anschluss an das einschichtige Plattenepithel des Bronchus zu finden sind als im übrigen Lungengewebe (Abb. 3.20.c).







---

*Abb. 3.20 Lunge**a : Schnitt aus Whole mount-ISH**b-c : Schnitte aus Paraffinschnitt-ISH**1 = Entoderm**2 = beginnende Lungenknospung**3 = Lungenknospe**4 = Oesophagus**5 = Lunge**6 = Bronchus**7 = einschichtiges Plattenepithel*

### 3.2.2.9 Ovidukt

Im Bereich des Beckens zwischen Niere und lateraler Bauchwand befindet sich beim weiblichen Hühnchen der Eileiter. Das embryonale Ovidukt weist noch kein zottenartiges Lumen auf, wie dies beim adulten Organ der Fall ist.

Alle Zellen im Ovidukt exprimieren *Flightless-I*. Zusätzlich zeigt sich eine Steigerung der Expression in der innersten zirkulären Schicht, die dem Lumen zugewandt ist und aus der später die Zotten des Eileiters mit ihren hochprismatischen Zilienzellen hervorgehen (Abb. 3.21.a-c).

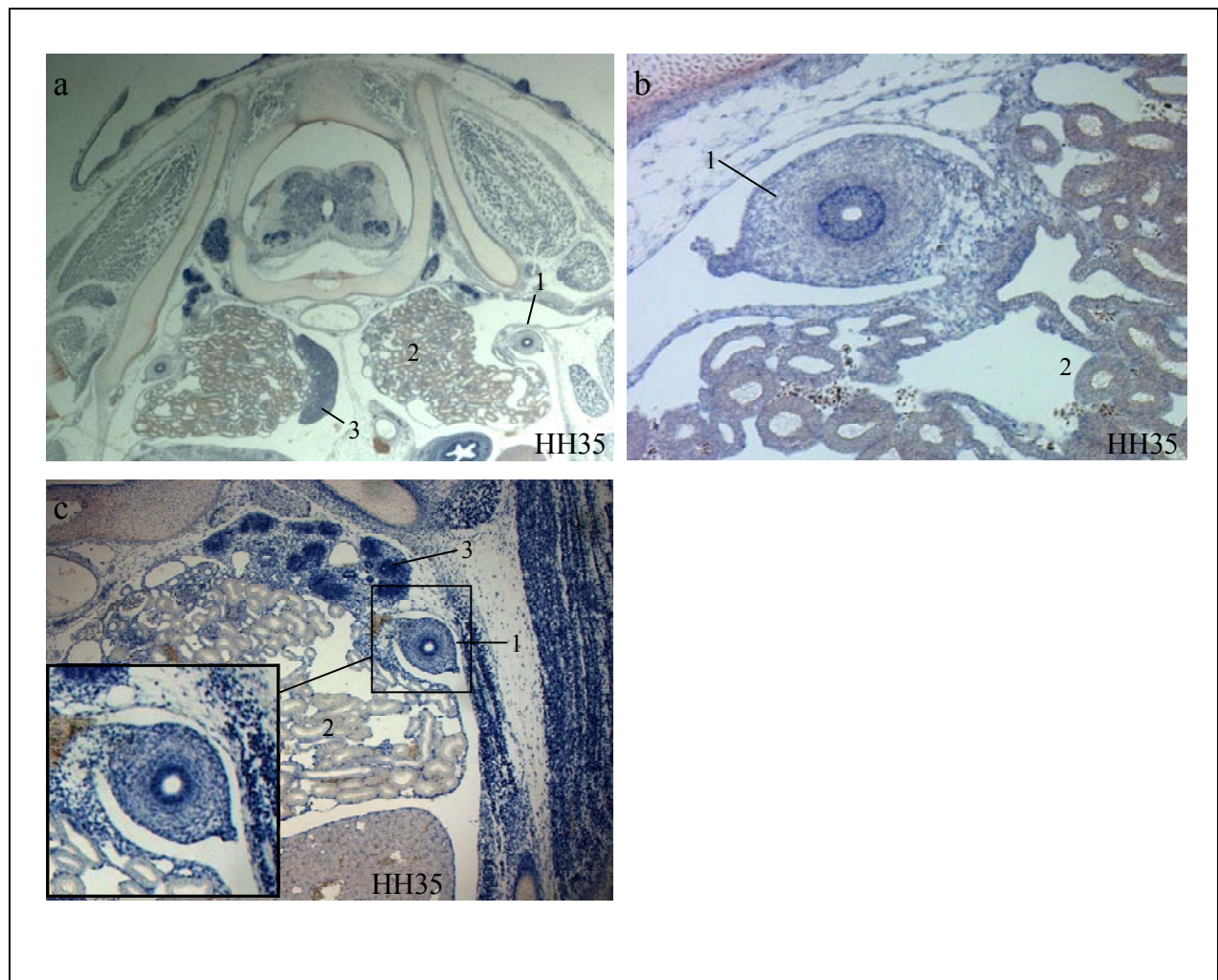


Abb. 3.21 Ovidukt

a-c: Schnitte aus Paraffinschnitt-ISH

1: Ovidukt

2: Mesonephros

3: Metanephros

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Analyse von *Flightless-I* im Zusammenhang mit der Muskulatur und den Somiten. Bei der Durchführung der Expressionsstudie zeigte sich, über die verschiedenen Entwicklungsstadien hinweg, ein breitgefächertes Vorkommen von *Flightless-I* in nahezu allen Organen. Die Entdeckung des Signals im Ovidukt war mehr ein Zufallsbefund als Gegenstand gezielter Untersuchungen. Leider befand sich unter den zahlreichen analysierten Embryonen älterer Stadien kein männliches Exemplar, so dass an dieser Stelle keine Aussage über die Expression von *Flightless-I* im männlichen Geschlechtstrakt getroffen werden kann.

### 3.2.2.10 Leber

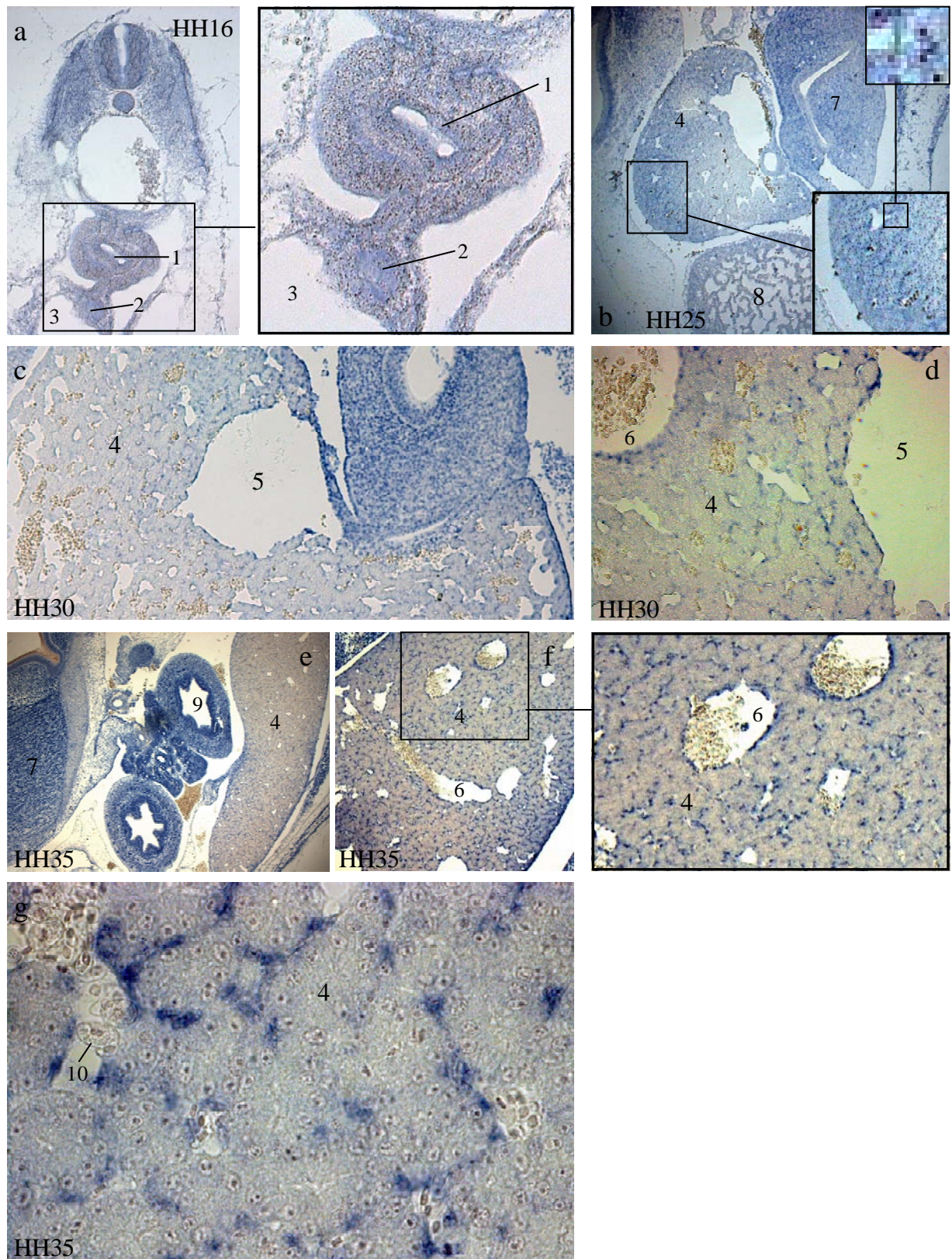
Ventral des Vorderdarmes entsteht zuerst das kraniale Leberdivertikel.

In der Abbildung 3.22.a ist zu erkennen, dass dieses kraniale Leberdivertikel homogen *Flightless-I* exprimiert. Mit der fortschreitenden Entwicklung des Embryos bildet sich in der Leber allmählich die organtypische „Bälkchenstruktur“ aus. Im Querschnitt durch einen Embryo Stadium HH25 (das entspricht einer Bebrütungsdauer von 4,5-5 Tagen) ist zu sehen, dass *Flightless-I* in sämtlichen Leberzellen exprimiert wird (Abb. 3.22.b). Dabei ist zu vermerken, dass die Ränder der Zellen gegenüber dem Zytoplasma eine stärkere Färbung aufweisen.

Nach 7 Tagen Bebrütungszeit, dies entspricht Stadium HH30, wird das Signal in den Leberzellen merklich schwächer. Dafür heben sich entlang der Leberbälkchen und entlang des Lumens der Blutgefäße Kapillarzellen durch eine gesteigerte Expression von *Flightless-I* hervor (Abb. 3.22.c u.d).

In Stadium HH35, nach 9 Tagen Bebrütungszeit, ist in den Leberzellen keine Expression mehr zu finden. Im Gegensatz dazu zeigt sich das Signal deutlich in den Kapillaren zwischen den Leberzellen (Abb.3.22.e-g).





## Abb. 3.22 Leber

a-b: Schnitte aus Whole mount-ISH

c-g: Schnitte aus Paraffinschnitt-ISH

1 = Entoderm

2 = craniales Leberdivertikel

3 = Ductus venosus

4 = Leber

5 = Gallengang

6 = Blutgefäße mit Erythrozyten

7 = Muskelmagen

8 = Herz

9 = Darm

10 = Erythrozyt

**3.2.2.11 Herz und Blutgefäße**

Die erste Gefäßstruktur des Embryos, in der sich eine Expression von *Flightless-I* findet, ist die Vena vitellina. In den Abbildungen 3.23a.A u. B, mit ihren jeweiligen Vergrößerungen, wird das Signal in dieser Struktur parallel des Neuralrohres, cranial der ersten Somiten, sichtbar.

In Stadium HH10, nach 33-38 Stunden Bebrütung, ist auf der rechten Seite des Embryos das primitive Herz zu erkennen. Wie die Abbildung 3.23a.C zeigt, exprimiert der Ventrikel das Signal von *Flightless-I*.

Mit der fortschreitenden Entwicklung des Herzens entstehen neben den Ventrikeln auch das rechte und das linke Atrium sowie der Conotruncus, aus dem die Ausflussregion der Ventrikel entsteht. Alle diese Strukturen exprimieren *Flightless-I* (Abb. 3.23a.D-J). In Abbildung 3.23a.H lässt sich zudem erkennen, wie die Expression dem zarten Gefäßgeflecht des Ventrikels folgt.

In den Abbildungen 3.23b.a-g sind Querschnitte durch die Strukturen von Herz und Blutgefäßen gezeigt.

Das prominenteste Blutgefäß im jungen Embryo ist die Aorta descendens. In Abbildung 3.23b.a wird die Expression in diesem Gefäß deutlich. Desweiteren findet sich das Signal von *Flightless-I* sowohl in der Vena vitellina, wie bereits im „Whole mount“ gezeigt, als auch im Sinus venosus (Abb. 3.23b.a). Auf der Höhe der Somiten taucht die paarige Aorta dorsalis auf, die ebenfalls *Flightless-I* exprimiert (Abb. 3.23b.b). In den Stadien HH25 und HH28 (Abb. 3.23b.c und e) zeigt sich das Signal von *Flightless-I* deutlich in der mit Blut gefüllten Aorta descendens.

In den Abbildungen 3.23b.d, f und g ist die Expression von *Flightless-I* im Herzen dargestellt. Über die einzelnen Stadien hinweg lässt sich gleichbleibend ein homogenes Signal in den einzelnen Zellen erkennen.

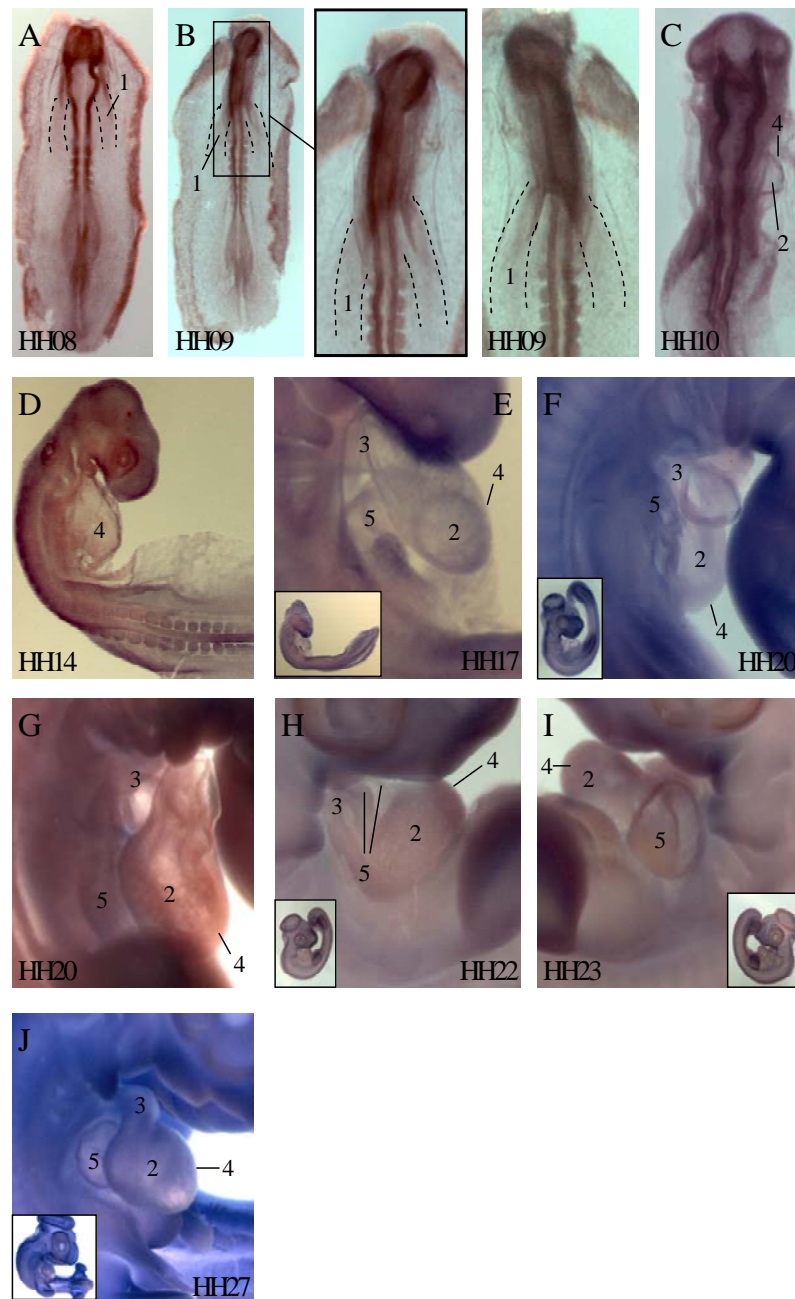


Abb. 3.23a Herz und Blutgefäße

A-J: Whole mounts

1 = Vena vitellina

2 = Ventrikel

3 = Conotruncus

4 = Herz

5 = Atrium



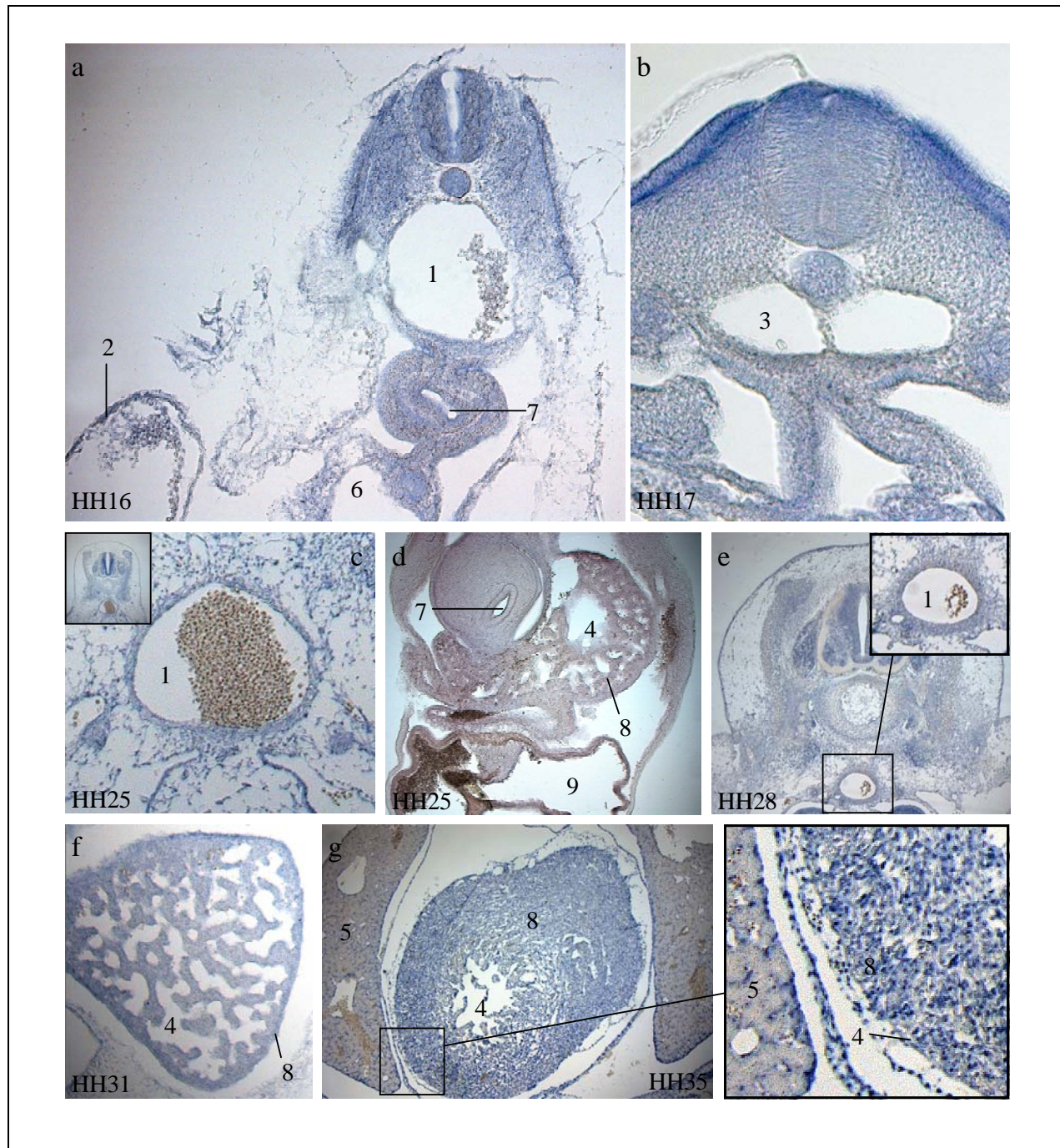


Abb. 3.23b Herz und Blutgefäße

a-c und e-g: Schnitte aus Paraffinschnitt-ISH

d : Schnitt aus Whole mount-ISH

1 = Aorta descendens

2 = Anteile der Vena vitellina mit Erythrozyten

3 = Aorta dorsalis

4 = Herz

5 = Leber

6 = Sinus venosus

7 = Vorderdarm

8 = Ventrikel

9 = Atrium

### 3.2.2.12 Verdauungstrakt

Der Verdauungstrakt dient beim Hühnchen, genauso wie bei allen anderen Wirbeltieren, der Aufnahme, Zerkleinerung und dem Weitertransport von Nährstoffen.

In Stadium HH08, nach 26-29 Stunden Bebrütung, sind die frühen Anteile des embryonalen Verdauungstraktes gut zu erkennen. Im „Whole mount“ ist die Expression von *Flightless-I* im Vorderdarm deutlich zu sehen. Noch stärker als im Vorderdarm selbst stellt sich die Expression am Rand der kranialen Verdauungsöffnung dar (Abb. 3.24.A). Der Querschnitt in Abbildung 3.24.a zeigt ein gleichmäßiges Signal von *Flightless-I* im Vorderdarm. Durch eine gesteigerte Expression tritt das Signal in der „oralen Membran“ besonders hervor. Auch findet sich unmittelbar dorsal der oralen Membran, im Vorderdarm selbst, eine dünne Linie mit gesteigerter Expression, die jedoch in ihrer Intensität nicht an die der oralen Membran heranreicht (roter Pfeil). In einem Querschnitt weiter kaudal durch den Embryo stellt sich der Vorderdarm als geschlossenes Rohr dar. Die Expression von *Fli-I* bleibt auch in diesem Abschnitt des Organs erhalten und findet zusätzlich noch eine Intensitätserhöhung in der oralen Platte (Abb. 3.24.b).

Auf Höhe der Somiten geht der Vorderdarm in den Mitteldarm über. Auch in diesem Teil des Verdauungstraktes bleibt die Expression von *Flightless-I* konstant (Abb. 3.24.d).

Die Abbildung 3.24.C erlaubt einen Einblick in den Situs der Bauchorgane von ventral. In der Medianen unterhalb von Herz und Leber tritt deutlich der Muskelmagen, begleitet von Duodenum, zum Vorschein.

#### **Muskelmagen**

Der Muskelmagen, zwischen Drüsenmagen und Duodenum gelegen, dient zusammen mit aufgenommenem Gritt der Zerkleinerung von Nahrungsbestandteilen. In der Abbildung 3.24.g zeigen fast alle Schichten des Muskelmagens eine Expression von *Flightless-I*.

Die aus einem Sehnenspiegel bestehende äußerste Schicht, die Tunica serosa gastris, weist ein deutliches Signal von *Flightless-I* auf. Hier erscheint die Expression homogen und ist gleichzeitig die Schicht mit der schwächsten Expression im Vergleich zu allen anderen Schichten des Muskelmagens. Unter dieser Schicht erscheint im ventralen Bereich des Organs die am kräftigsten gefärbte Struktur, das Stratum longitudinale der Tunica muscularis gastris. Diese stark *Fli-I* exprimierende Schicht besteht in der Hauptsache aus längs getroffenen Muskelfasern von kräftiger Färbung. Weiter Richtung Lumen vordringend folgt das Stratum circulare der Tunica muscularis gastris, das ebenfalls deutlich das Signal von *Flightless-I* exprimiert und in seiner Intensität fast genauso stark ist wie die Expression des Stratum longitudinale. Die innerste, an das Lumen grenzende Struktur ist die keratinoide Schicht des



Muskelmagens, auch bekannt als Cuticula gastrica. Diese aus Drüsensekret und Magensäure bestehende Hornschicht ist die einzige Struktur des Muskelmagens, die kein Signal von *Flightless-I* exprimiert. Zwischen der Keratinoidschicht und den Muskelschichten existiert noch eine weitere, die Tela submucosa gastris, mit den zukünftigen Drüsentubuli. Diese Schicht zeigt in der Mitte eine kräftige Expression, wohingegen die dem Lumen zugewandte Seite und die an die Muskulatur grenzende Seite das Signal in abgeschwächter Form zeigen.

### **Drüsenmagen**

Dem Muskelmagen vorangestellt ist der Drüsenmagen.

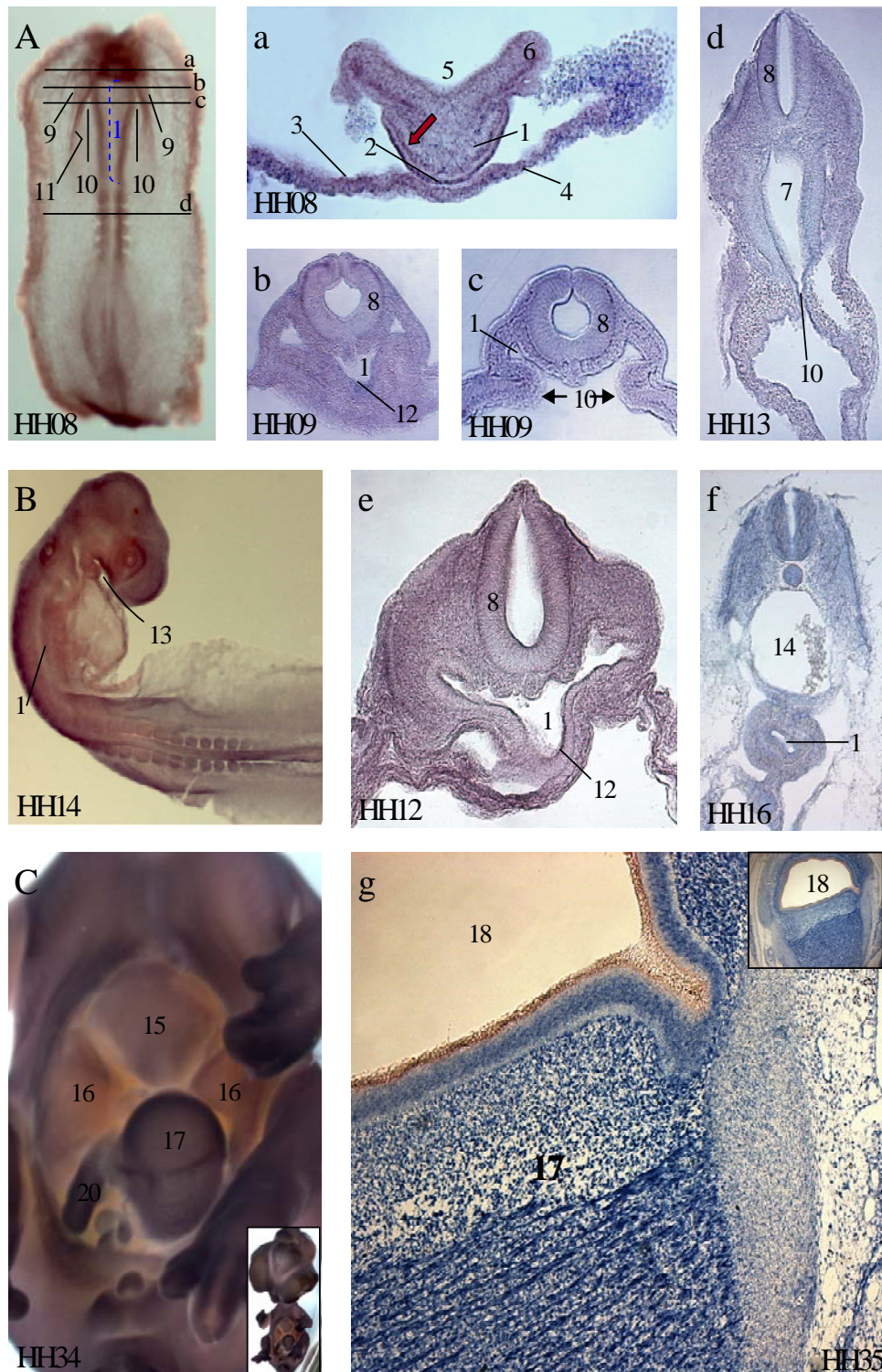
Abbildung 3.24.h veranschaulicht die Schichtung des Drüsenmagens im Querschnitt. Im Innern dieses Magens findet sich die Schicht der oberflächlichen Propriadrüsen, die in ihrem hochprismatischen Epithel eine deutliche Expression von *Flightless-I* zeigen. Dabei fällt auf, dass sich das Signal hauptsächlich auf die Mitte der Epithelzellen beschränkt, während im apikalen Teil, im Bereich der Mikrovilli, das Signal völlig fehlt. Die oberflächlichen Propriadrüsen werden umgeben von den tiefen Propriadrüsen. Diese zeigen ebenfalls das Signal von *Flightless-I*. Die isoprismatischen Zellen lassen im basalen Bereich zusätzlich eine leichte, teilweise punktuelle Signalverstärkung erkennen. Im apikalen Teil dagegen verliert sich das Signal, wie dies auch in den oberflächlichen Propriadrüsen der Fall ist. Sowohl die tiefen als auch die oberflächlichen Propriadrüsen sind von einer stark exprimierenden dünnen Schicht umgeben. Die die Drüsen umgebende Lamina muscularis mucosa zeigt ebenso wie die Tunica muscularis eine Expression von *Flightless-I*.

### **Darm**

In allen Bereichen des embryonalen Darmes findet sich eine Expression von *Flightless-I*.

Mit der innersten Schicht beginnend, findet sich das Signal in den hochprismatischen Zellen der Darmschleimhaut. Im Gegensatz zur Magenschleimhaut fehlt hier ein signalfreier apikaler Mikrovillisaum. Weiter in die Peripherie vordringend, findet sich die Expression sowohl in der an die Schleimhaut grenzenden Lamina muscularis mucosa als auch im dicken Stratum circulare und im dünnen Stratum longitudinale der Tunica muscularis (Abb. 3.24.i-k).

Unmittelbar unterhalb der Darmschleimhaut, im Bereich der späteren Glandulae intestinales, zeigt sich eine verstärkte Expression im Vergleich zur übrigen Lamina muscularis mucosa.



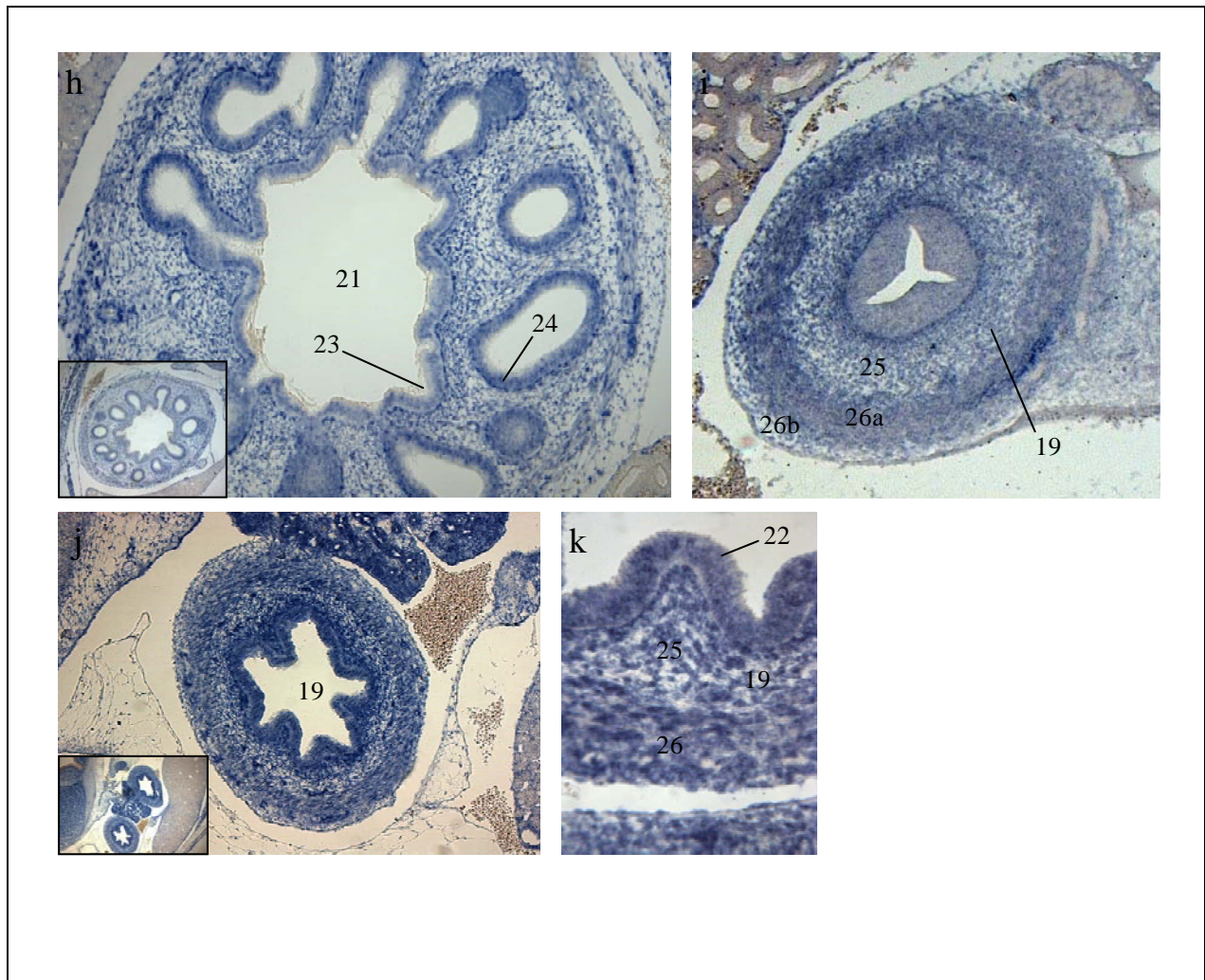


Abb. 3.24 Verdauungstrakt

A-C : Whole mounts

a-e : Schnitte aus Whole mount-ISH

f-k : Schnitte aus Paraffinschnitt-ISH

- 1 : Vorderdarm
- 2 : orale Membran
- 3 : Ektoderm des Proamnion
- 4 : Entoderm des Proamnion
- 5 : Neuralrinne
- 6 : Neuralfalte
- 7 : Mitteldarm
- 8 : Neuralrohr
- 9 : lateraler Rand des Vorderdarms
- 10 : craniale Verdauungsöffnung
- 11 : Rand der kranialen Verdauungsöffnung
- 12 : orale Platte

- 13 : Stomatodeum (Mundbucht)
- 14 : absteigende Aorta
- 15 : Herz
- 16 : Leber
- 17 : Muskelmagen
- 18 : Lumen des Muskelmagens
- 19 : Darm
- 20 : Duodenum
- 21 : Proventriculus (Drüsenmagen)
- 22 : Darmschleimhaut
- 23 : oberflächliche Propriadrüsen
- 24 : tiefe Propriadrüsen
- 25 : Lamina muscularis mucosa
- 26 : Tunica muscularis mit Stratum circulare (a) und Stratum longitudinale (b)

### 3.2.2.13 Niere

Während der Entwicklung der Harnausscheidungsorgane werden drei Generationen von Nierenanlagen unterschieden: Als erstes entsteht nach 36 Stunden Bebrütungszeit auf Höhe des 5.-15. Somiten die rudimentäre und funktionslose Vorniere, die bereits am 8. Tag der Entwicklung wieder verschwunden ist. Zwischen dem 5. und 15. Tag taucht im Bereich des 13.-30. Somiten die Urnieren auf. Diese zweite Generation von Niere besitzt im Embryo exkretorische Funktion. Abgelöst wird die Urnieren am Ende des 4. Tages von der sogenannten Nachnieren. Diese letzte Nierengeneration entsteht auf Höhe des 31.-33. Somiten und stellt nun das permanente Harnausscheidungsorgan des Hühnchens dar, welches auch im adulten Tier erhalten bleibt.

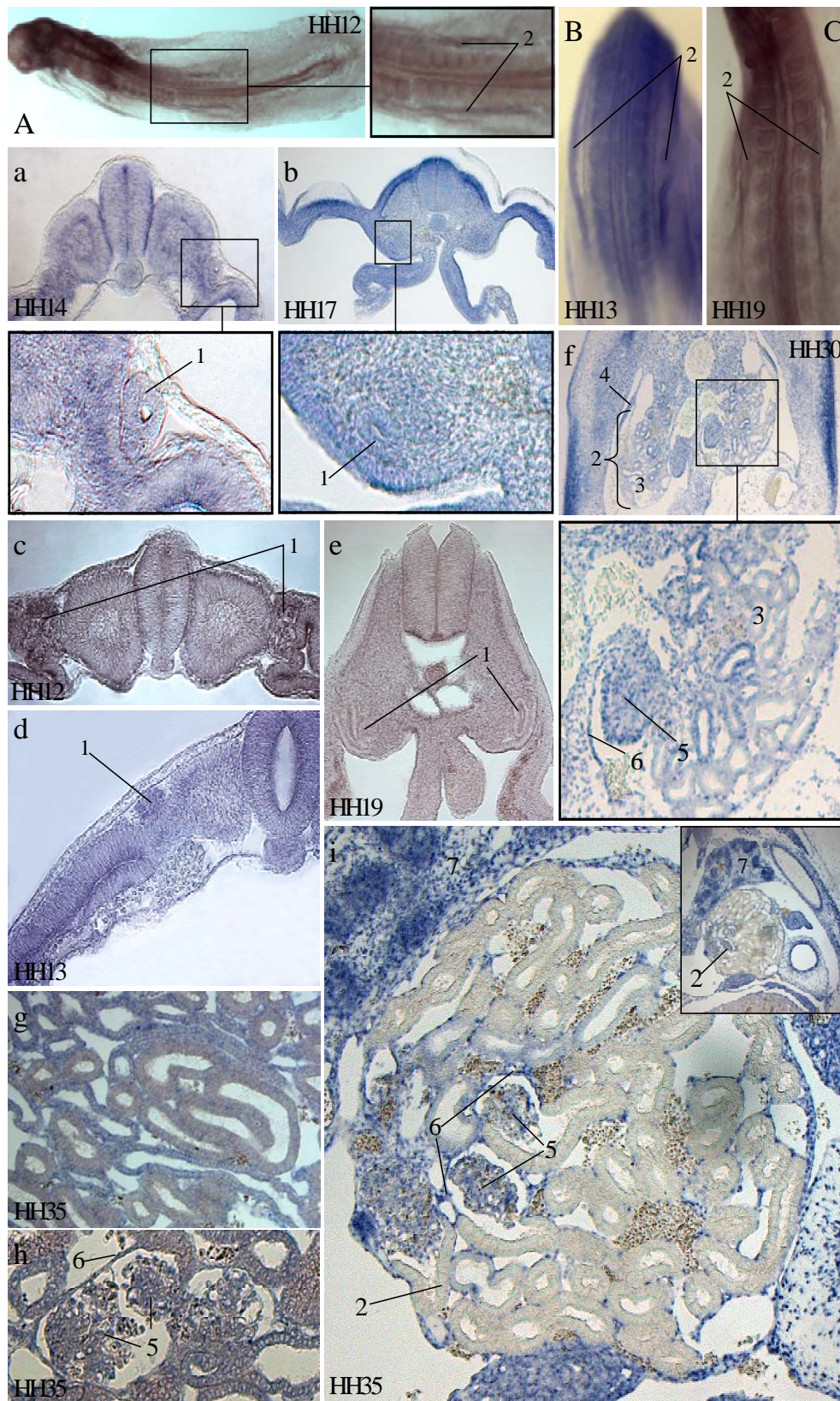
Die Abbildungen 3.25.A-C zeigen die Expression von *Flightless-I* in der Urnieren (Mesonephros) in den Stadien HH12, HH13 und HH19. Die „Whole mount“ Abbildungen lassen ein kräftiges, homogenes Signal erkennen.

Um die weitere Expression während der Nierenentwicklung zu beobachten, war es notwendig, Gewebeschnitte zu betrachten. Die Querschnitte 3.25.a-e veranschaulichen die Expression von *Flightless-I* im Wolffschen Gang. Dieser weist in allen untersuchten Stadien eine homogene Färbung auf.

In älteren Embryonen lässt sich die Expression von *Fli-I* in Meta- und Mesonephros verfolgen. Die Abbildungen 3.25.f-j und k-m lassen die heterogene Expression in den Tubuli des Mesonephros erkennen. Während einige Tubuli das Signal deutlich exprimieren, zeigen andere keinerlei Expression. Das Signal beschränkt sich dabei dann lediglich auf das die Tubuli begleitende Bindegewebe. In den Zellen des Bindegewebes ist die Expression noch sehr viel stärker als in den *Fli-I* positiven Tubuli. Desweiteren findet sich *Flightless-I* nicht nur in einigen Tubuli des Mesonephros und in dessen Bindegewebe, sondern sowohl in der Bowmannschen Kapsel als auch in den Kapillaren der Glomerula selbst (Abb. 3.25.h und i).

In den Abbildungen 3.25.j und k ist die Expression im Metanephros dargestellt. Das Organ exprimiert das Signal von *Flightless-I* in allen Strukturen. Im Bindegewebe ist die Expression deutlich zu erkennen. Darüber hinaus exprimieren sämtliche Tubuli das Signal. Dabei fällt auf, dass einige Tubuli zum einen eine homogene und zum anderen eine sehr viel stärkere Expression aufweisen. Bei den Tubuli mit der stärkeren und homogenen Expression zeigt sich zudem eine drastische Signalverstärkung im umliegenden Bindegewebe. Auf diese Weise entstehen im Metanephros regelrechte Inseln von höchster Expressionsstärke (Abb. 3.25.j).







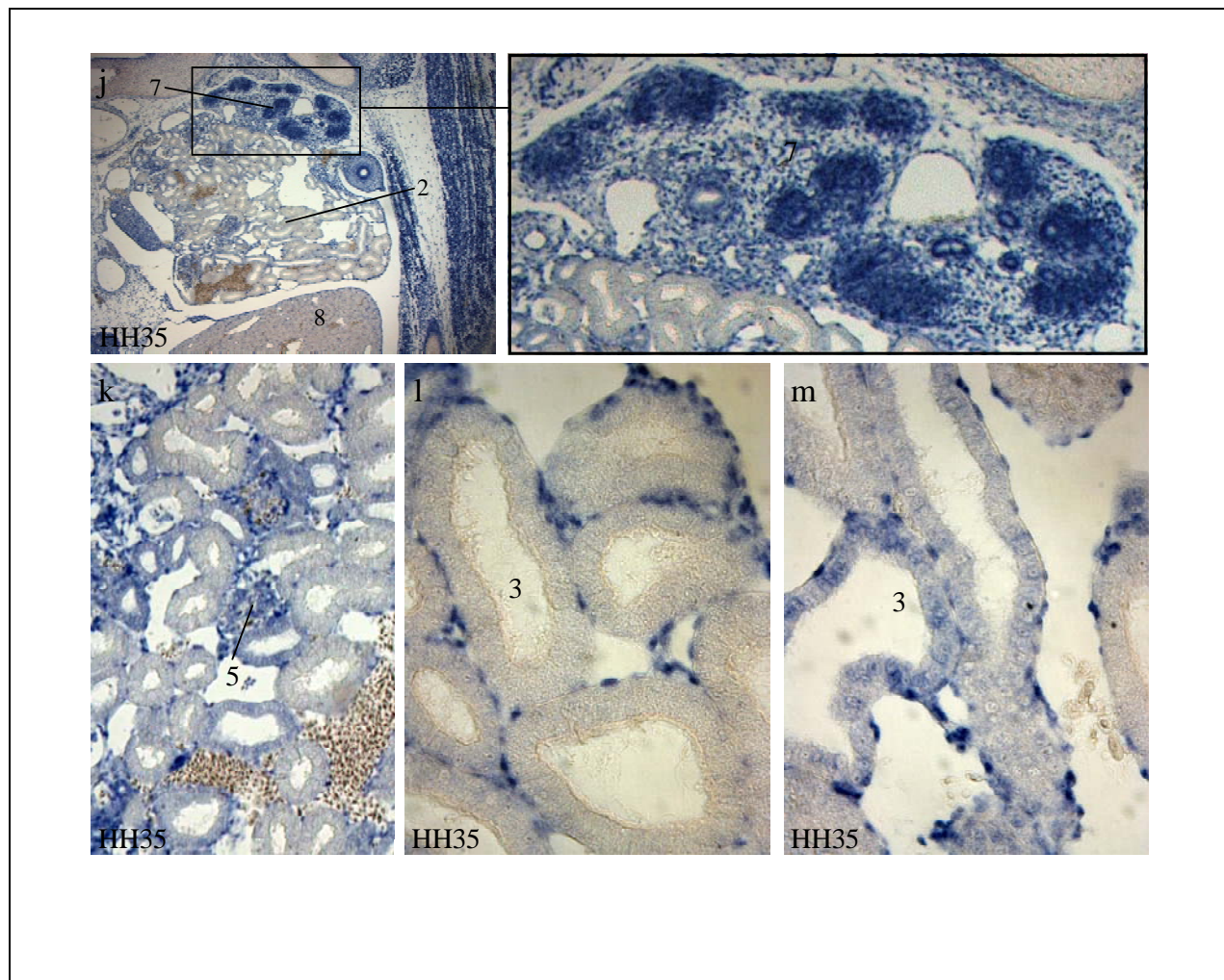


Abb. 3.25 Niere

A-C : Whole mounts

a-m : Schnitte

a-e : Schnitte aus Whole mount-ISH

f-m : Schnitte aus Paraffinschnitt-ISH

1 = Wolffscher Gang

2 = Mesonephros

3 = Tubuli des Mesonephros

4 = Gang des Mesonephros

5 = Glomerulum

6 = Bowmannsche Kapsel

7 = Metanephros

8 = Leber

### 3.3. Überexpression von *Flightless-I*

Nach dem Erhalt der Ergebnisse aus der Expressionsstudie galt es nun im zweiten Teil dieser Dissertation herauszufinden, welche Funktion *Flightless-I* in der Embryonalentwicklung zukommt und in welchem Verhältnis *Flightless-I* zu den anderen Entwicklungsfaktoren steht.

Wie in der Expressionsstudie gezeigt, wird *Flightless-I* sowohl in den Somiten und in der Skelettmuskulatur als auch in der glatten Muskulatur der Organe exprimiert. Diese Tatsache und der Sachverhalt, dass *Flightless-I*, wie schon in anderen Untersuchungen gezeigt (Kremer; De Couet et al.), zur Gelsolin-Superfamilie der aktinbindenden Proteine gehört, machte die Untersuchung von *Flightless-I* im Zusammenhang mit den Muskelentwicklungsfaktoren für diese Dissertation sehr interessant.

#### 3.3.1 Konstruktion des Überexpressionsplasmids

Der erste Schritt für die Überexpression war die Konstruktion eines funktionsfähigen Überexpressionsplasmids für *Flightless-I*.

Neben der „full length“ von *Flightless-I* und dem für die spätere Detektion wichtigen grünen Fluoreszenzprotein EGFP, musste das Überexpressionsplasmid auch einen geeigneten Promotor enthalten. Hierfür wurde ein beta-Aktin-Promotor ausgewählt.

Zunächst war für die Konstruktion die Herstellung eines geeigneten Vektors wichtig, der zusätzlich das für die Detektion wichtige Fluoreszenzprotein EGFP enthielt. Hierfür wurde ein bereits im Labor vorhandener pCMS-EGFP-Vektor (5541bp) mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und XhoI für die Insertion der „full length“ von *Flightless-I* vorbereitet (Abb. 3.26). Die Größe des gesuchten Fragments, das als „Rückgrat“ des Plasmids fungieren sollte, betrug 4837bp.

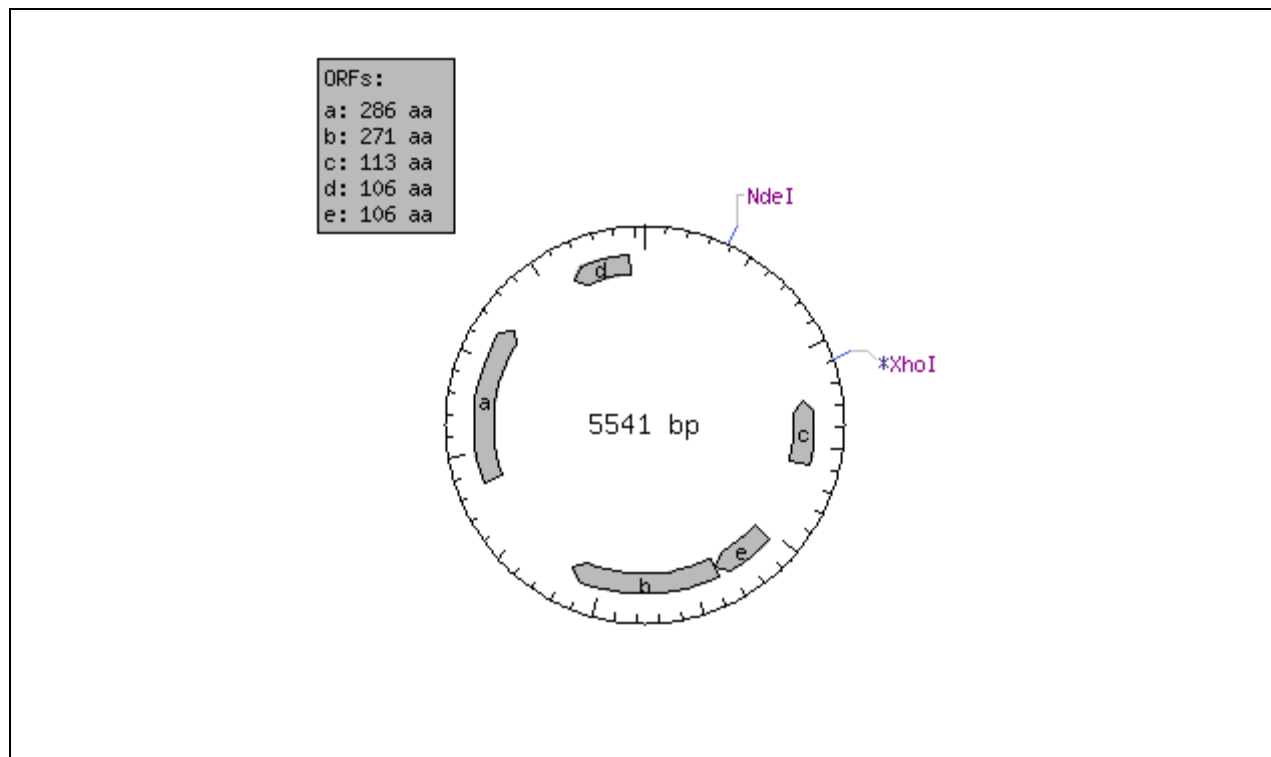
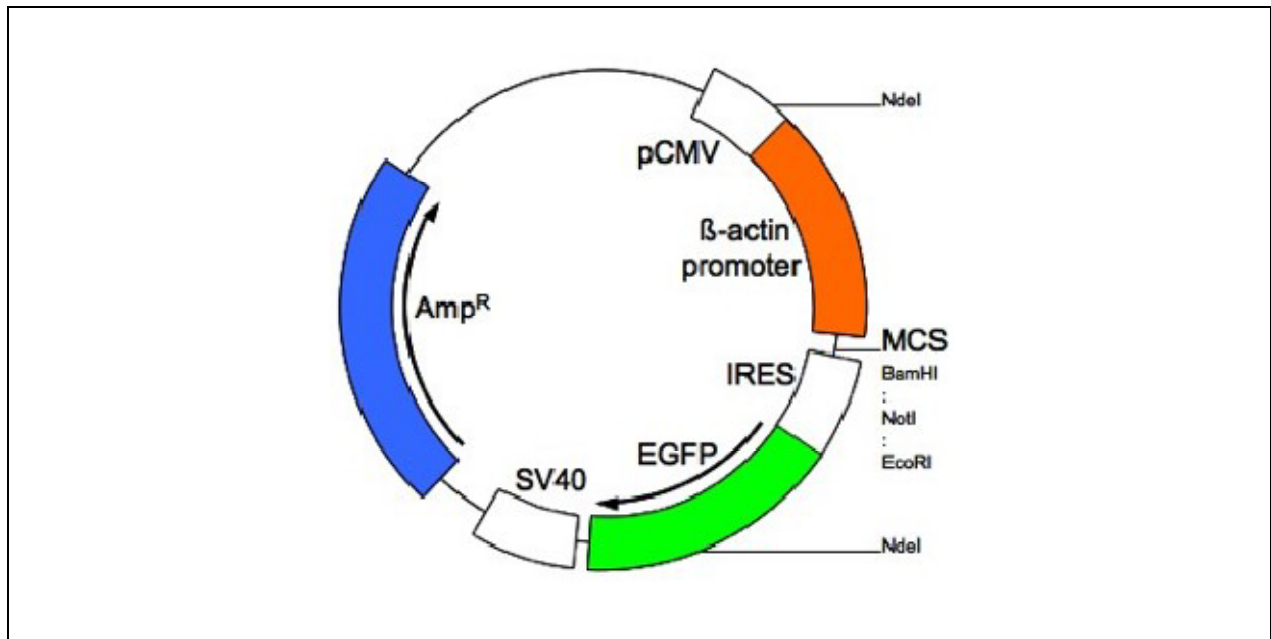


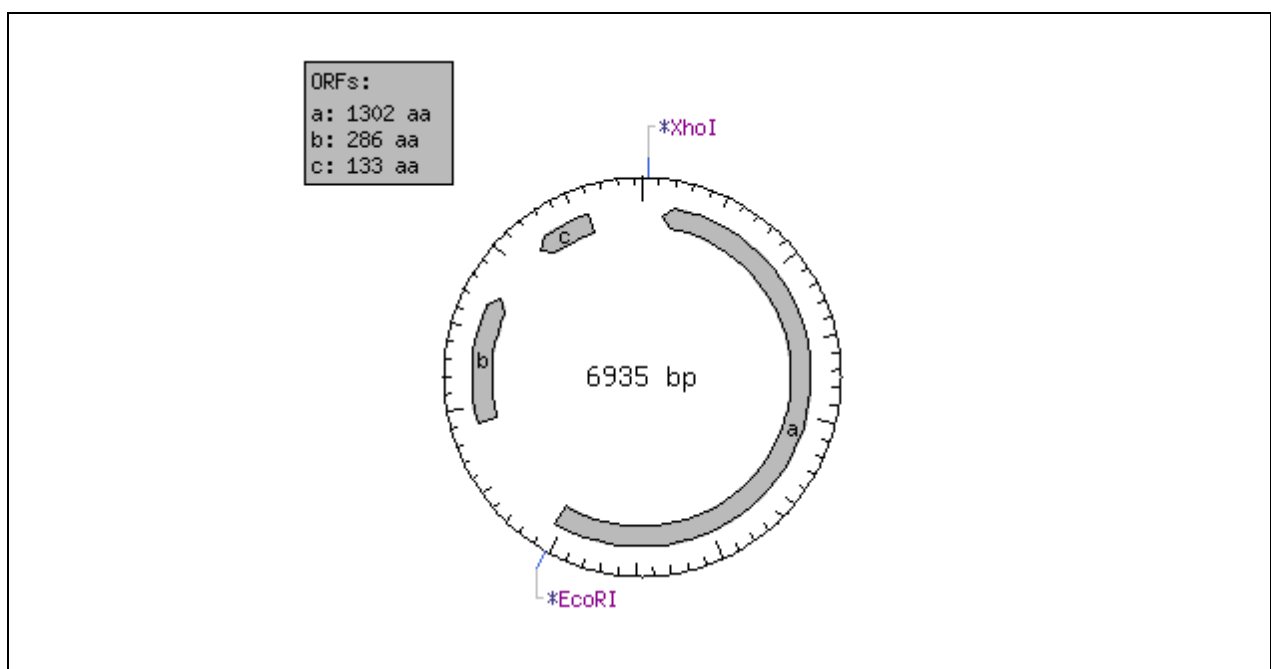
Abb. 3.26 pCMS-EGFP-Vektor

Der zweite Schritt bestand darin, einen beta-Aktin-Promotor zu gewinnen. Um den 1,4kb großen Promotor zu erhalten, wurde dieser mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und EcoRI aus einem bereits im Labor vorhandenen beta-Aktin-Promotor-Plasmid herausgelöst (Abb. 3.27).



Abb. 3.27 *beta-Aktin-Promotor-Plasmid*

Zur Gewinnung des Inserts, und somit dem wichtigsten Teil des Überexpressionsplasmids, wurde aus dem aus München erhaltenen *pmodi-KS-cFlightless-I-Plasmid* (6935bp) die „full length“ von *Flightless-I* herausgetrennt (Abb.3.28). Um dieses 3982bp große Insert zu erhalten, wurden die Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI verwendet.

Abb. 3.28 *pmodi-KS-cFlightless-I-Plasmid*

Nach dem Erhalt der drei Fragmente, pCMS-EGFP (4837bp), *cFlightless-I* (3982bp) und beta-Aktin-Promotor (1,4kb), sollten diese zu einem einzigen Plasmid ligiert werden. Abschließend sollte das neu gewonnene Plasmid mit Hilfe der Restriktionsendonuklease BamHI überprüft werden und so vier Fragmente mit den Größen 4893bp, 2952bp, 1363bp und 1031bp ergeben.

Die Restriktion von pCMS-EGFP mit XhoI und die Restriktion von beta-Aktin-Promotor-Plasmid mit EcoRI ergab die sofortige Linearisierung der beiden Plasmide. Der Versuch, das *pmodi-KS-cFlightless-I-Plasmid* mit XhoI zu schneiden, ergab kein positives Ergebnis. Normalerweise sollte auch dieses Plasmid nach der Restriktion in linearisierter Form vorliegen, aber, wie die Gelelektrophorese zeigte, lag das Plasmid immer noch in der geschlossenen Ringstruktur vor und bildete im Gel einen sogenannten „Supercoil“ anstelle einer klaren Bande (Abb. 3.29A). Der Versuch, das *cFlightless-I-Plasmid* mit XhoI zu schneiden, wurde mehrfach wiederholt, jedoch ohne Erfolg. Daraufhin wurde eine neue Versuchsreihe angesetzt, in der der Restriktionsansatz verändert wurde. Die Anteile an doppelt destilliertem Wasser und Puffer wurden erhöht, die Menge der verwendeten DNA wurde verringert und zusätzlich vor dem Versuch gründlich durchmischt, um etwaiger Klumpenbildung entgegenzuwirken. Auch mit diesem Versuchsansatz konnte keine Linearisierung erzielt werden. Desweiteren wurde versucht, das Plasmid durch eine längere Inkubation mit Restriktionsenzym zu öffnen. Mit XhoI wurde nicht wie gewöhnlich für 2 Stunden inkubiert, sondern über Nacht. Nach mehrmaligen Versuchen auf diese Weise wurden schließlich drei Banden erhalten. Eine der Banden war viel zu klein und lag bei ca. 4000bp, während eine andere Bande viel zu groß zwischen ca. 8000-9000bp lag. Die dritte Bande lag mit ca. 7000bp ungefähr im richtigen Bereich, war aber viel zu schwach, um isoliert zu werden, geschweige denn um damit weiterzuarbeiten. Auch konnte dieses Ergebnis nicht wieder repliziert werden und wurde deshalb als äußerst zweifelhaft eingestuft und vom weiteren Vorgehen ausgeschlossen.

Im nächsten Versuch wurde das *pmodi-KS-cFlightless-I-Plasmid* vor der Restriktion denaturiert. Hierfür wurde das Plasmid zuerst bei 95°C für 5 Minuten erhitzt und dann weitere 5 Minuten lang auf Eis abgekühlt. Auch hier konnte, sowohl mit dem normalen Standardansatz als auch mit dem modifizierten Restriktionsansatz, bei dem Puffer und doppelt destilliertes Wasser erhöht wurden, während die DNA-Menge verringert wurde, keine Linearisierung erzielt werden.

Um dem Problem näher auf den Grund zu gehen, wurde das *pmodi-KS-cFlightless-I-Plasmid* mit dem zweiten dafür vorgesehenen Restriktionsenzym EcoRI inkubiert. Bereits nach 2 Stunden zeigte sich mit normalem Versuchsansatz eine tadellose Linearisierung des Plasmids (Abb. 3.29B).

Somit wurde klar, dass das Problem auf Seiten der Restriktionsendonuklease XhoI lag, während EcoRI in der Lage war, das Plasmid ohne Probleme zu schneiden. Gleichgültig welcher Versuchsansatz durchgeführt wurde, mit XhoI konnte das *pmodi-KS-cFlightless-I-Plasmid* nicht geschnitten werden.

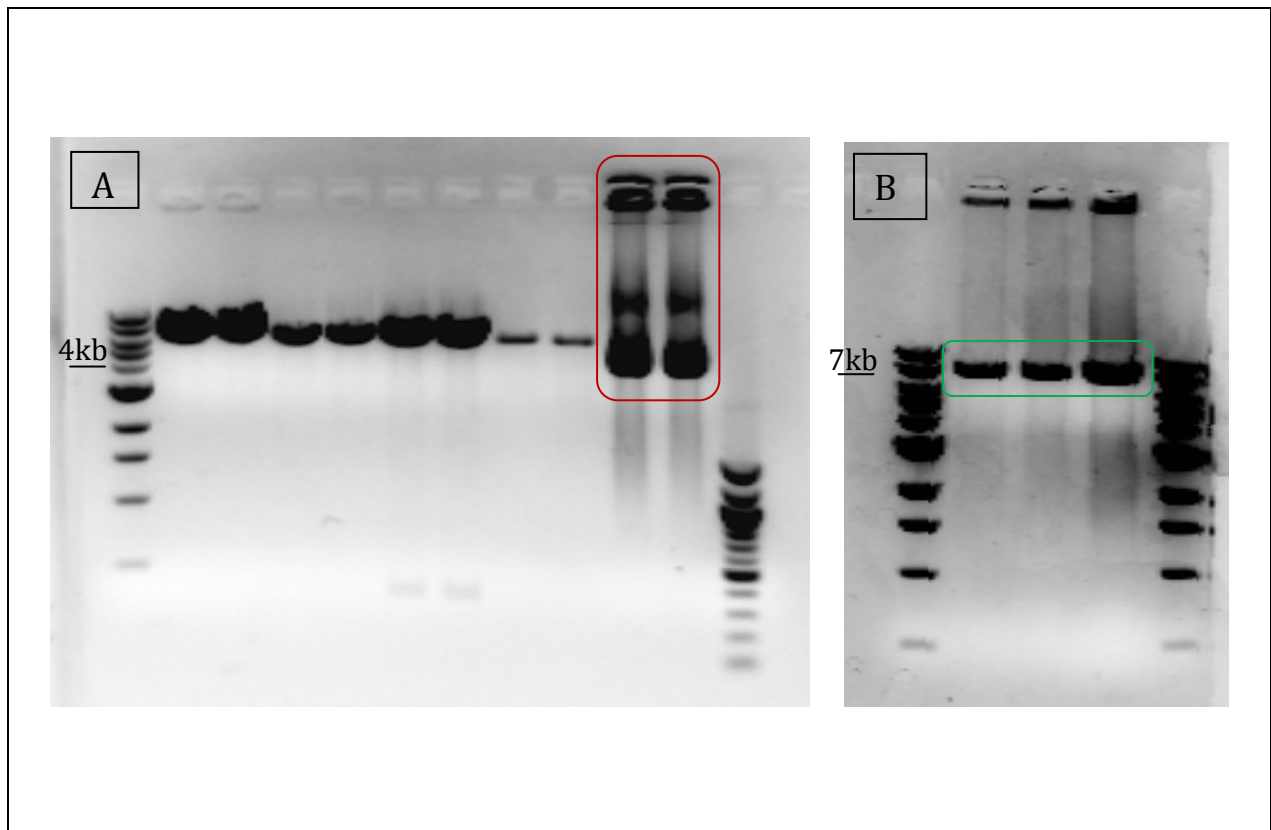


Abb. 3.29 A veranschaulicht den Supercoil von *pmodi-KS-cFlightless-I-Plasmid* nach dem Versuch der Restriktion mit XhoI.

In B sind die Banden von *pmodi-KS-cFlightless-I-Plasmid* nach erfolgreicher Linearisierung mit EcoRI gezeigt.

Aufgrund dieses Sachverhaltes war es nicht möglich, das Überexpressionskonstrukt nach dem vorgesehenen Bauplan anzufertigen. Nach eingehender Studie der Gensequenz des *pmodi-KS-cFlightless-I-Plasmids* wurde ein neuer Konstruktionsplan unter Umgehung von XhoI entworfen. Es war nach wie vor geplant, das pCMS-EGFP-Plasmid als Vektor zu benutzen; ebenso sollte der vorgesehene beta-Aktin-Promotor zum Einsatz kommen. Die größte Schwierigkeit ergab sich im Herauslösen der „full length“ von *Flightless-I* aus dessen Plasmid. Da XhoI nicht mehr verwendet werden konnte, musste die Sequenz von *Flightless-I* mit Hilfe von EcoRI, BglII und BamHI in zwei Teilstücke zerlegt werden. Beide Teilstücke sollten anschließend in ein leeres pDrive-Plasmid inkloniert werden. Danach war geplant, *Flightless-I* mit EcoRI und MluI aus dem pDrive-Plasmid herauszuschneiden und schließlich in den pbeta-Aktin-EGFP-Vektor einzuklonieren.

Der erste Schritt bestand darin, den 5541bp großen pCMS-EGFP-Vektor mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und EcoRI zu öffnen und so ein 4832bp großes Fragment als „Rückgrat“ des Vektors zu erhalten (Abb. 3.30).

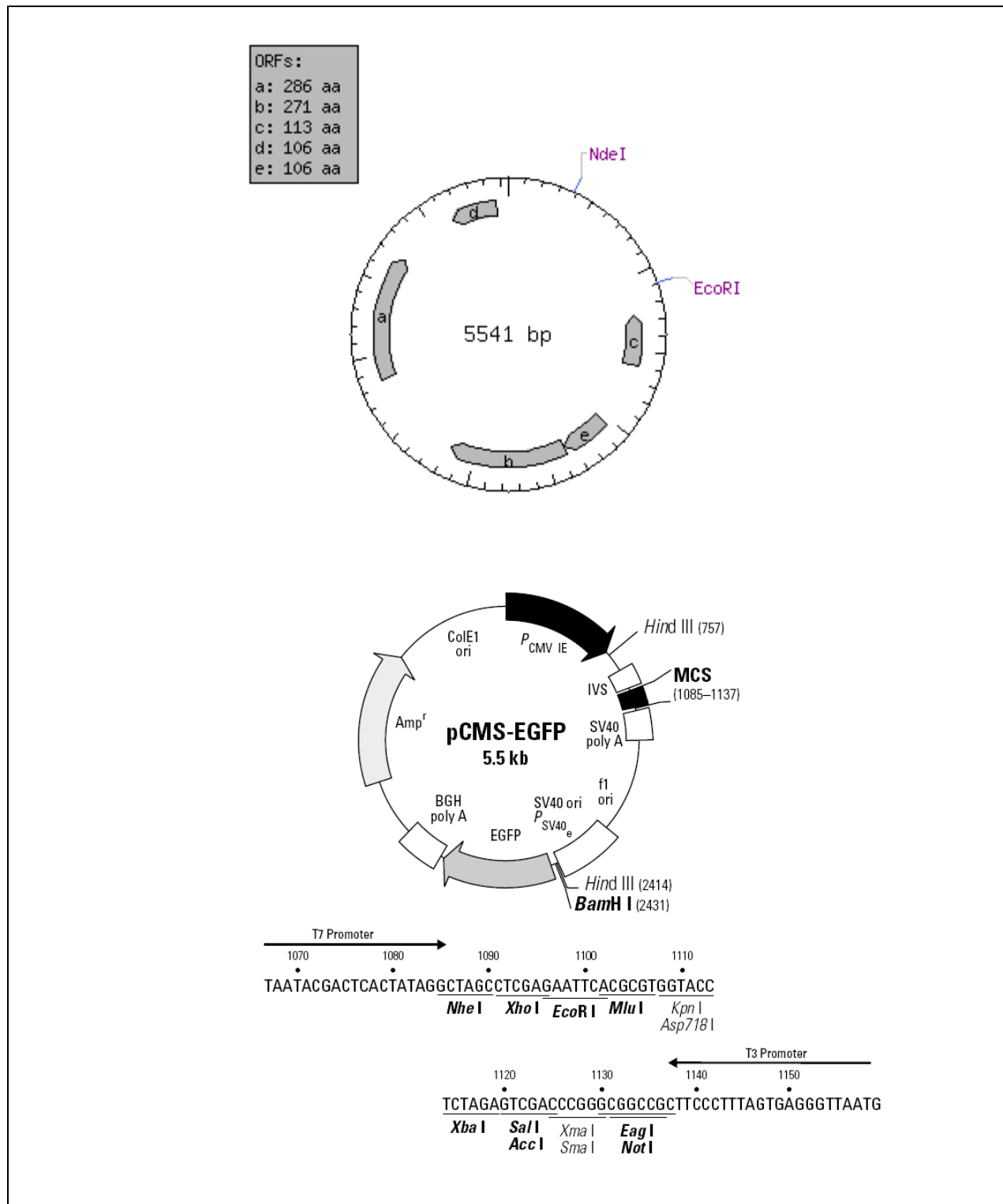


Abb. 3.30 Plasmid mit pCMS-EGFP-Vektor

Danach konnte, wie auch im ersten Versuchsansatz, der 1,4kb große beta-Aktin-Promotor durch NdeI und EcoRI aus dem pbeta-Aktin-Promotor-Plasmid herausgelöst werden. Der pCMS-EGFP-Vektor und der beta-Aktin-Promotor wurden dann miteinander ligiert und die positiven Klone mittels BamHI detektiert. Die positiven Klone ergaben wie geplant zwei Banden mit 4,9kb und 1,3kb (Abb. 3.31).

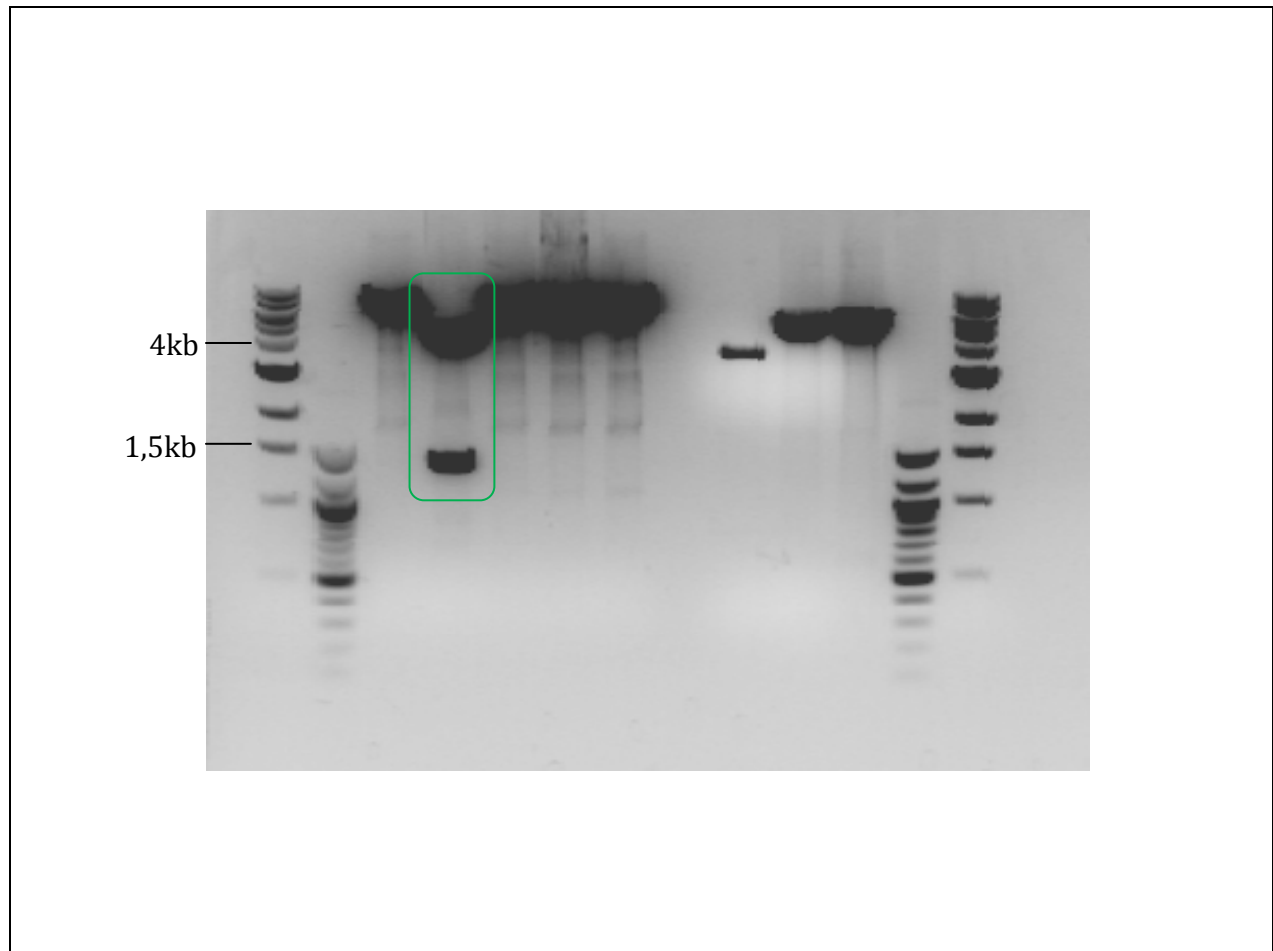


Abb. 3.31 Positiver Klon des pCMS-EGFP-beta-Aktin-Promotor-Plasmids

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe von EcoRI und BglII das erste der beiden Bruchstücke (1711bp) von *Flightless-I* herausgelöst. Danach wurde durch die Restriktion mit BamHI und BglII das zweite Bruchstück (2247bp) gewonnen (Abb. 3.32).

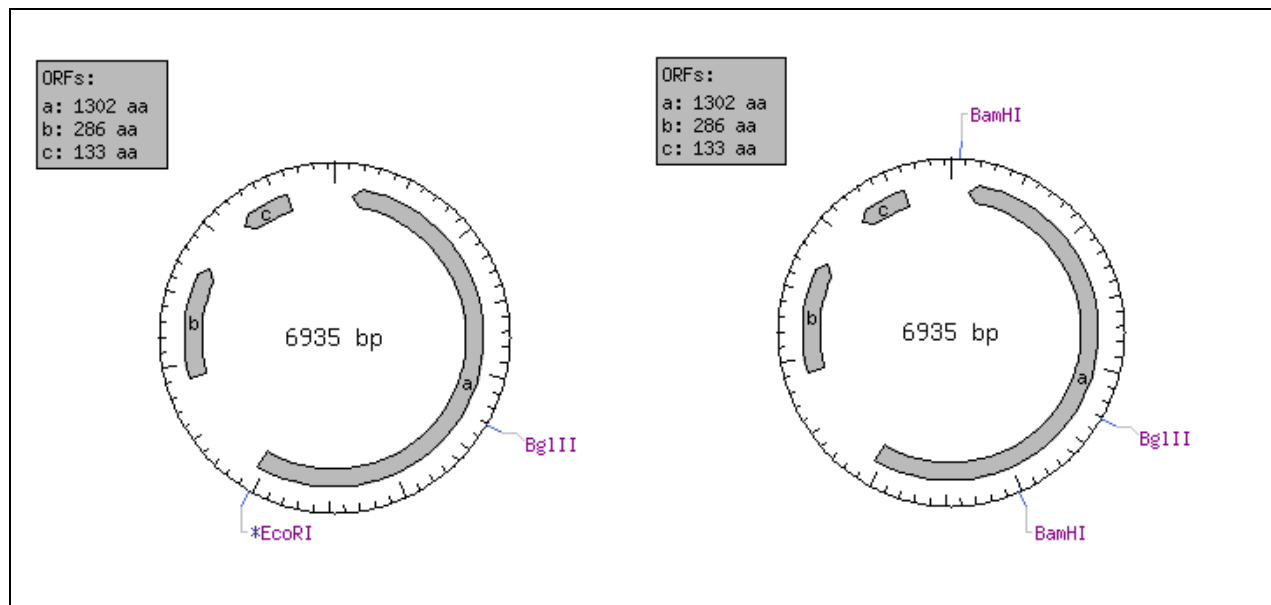


Abb. 3.32 Herauslösen der zwei Teilstücke von *Flightless-I* aus dem Transportplasmid

Ein im Labor bereits vorhandenes leeres pDrive-Plasmid wurde mit EcoRI und BamHI für die Insertion der *Flightless-I*-Bruchstücke vorbereitet. Zuletzt wurden die beiden Inserts mit dem leeren Vektor (3,85kb) ligiert und die positiven Klone abermals durch BamHI überprüft.

Auch hier ließ sich das neu entstandene 7787bp große Plasmid wie geplant in zwei Banden mit den Größen 4835bp und 2952bp zerlegen (Abb. 3.33).



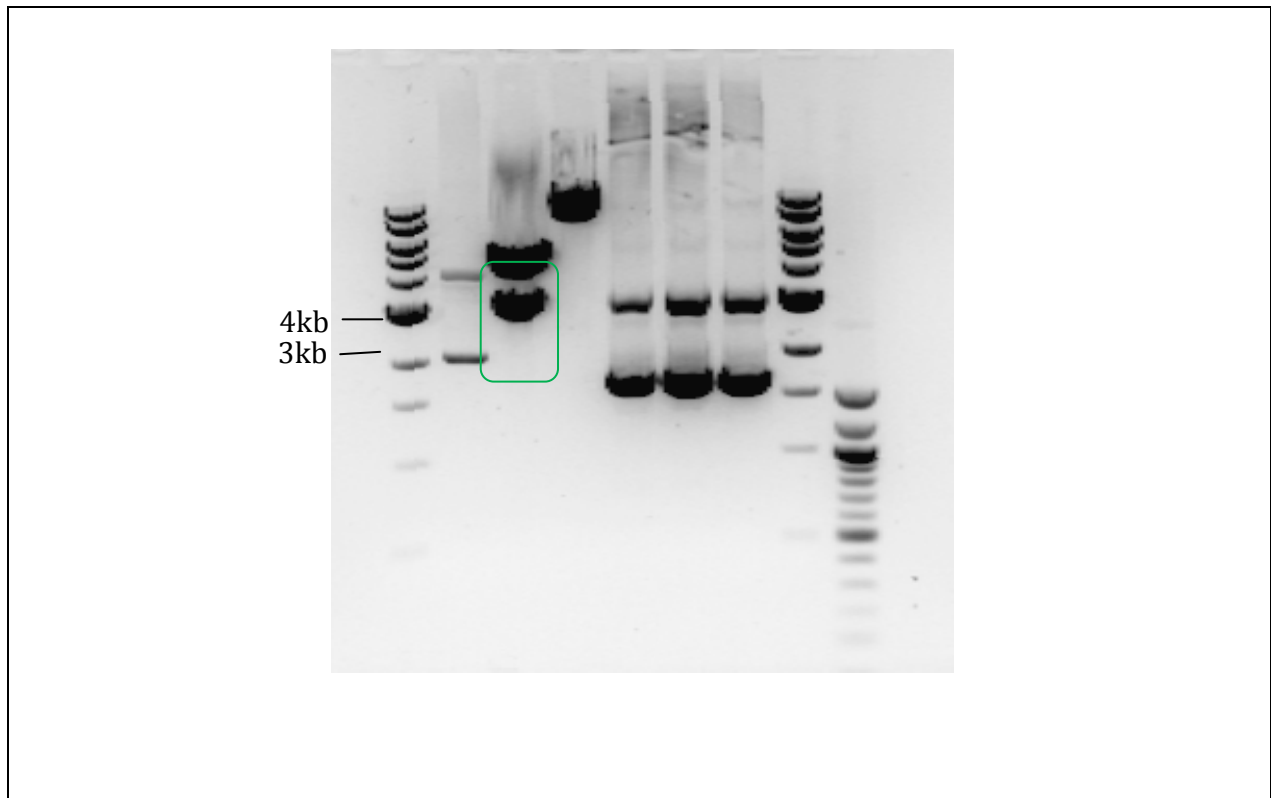


Abb. 3.33 Positiver Klon des *pDrive-cFlightless-I* Plasmids  
Die Banden weisen eine Größe von 4835bp und 2952bp auf.

Der dritte und letzte Schritt bestand darin, die Sequenz von *Flightless-I* als Ganzes aus dem *pDrive*-Vektor herauszulösen und schließlich in den *pbeta-Aktin-EGFP*-Vektor einzupflanzen.

Hierfür wurde zunächst das *pbeta-Aktin-EGFP*-Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *MluI* vorbereitet. Anschließend wurde das *pDrive-cFlightless-I*-Plasmid mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *ScaI* geöffnet. Aus dem nun linearisierten Plasmid konnte jetzt das 3972bp große Fragment, welches für die komplette „full length“ von *cFlightless-I* kodiert, herausgelöst werden (Abb. 3.34).

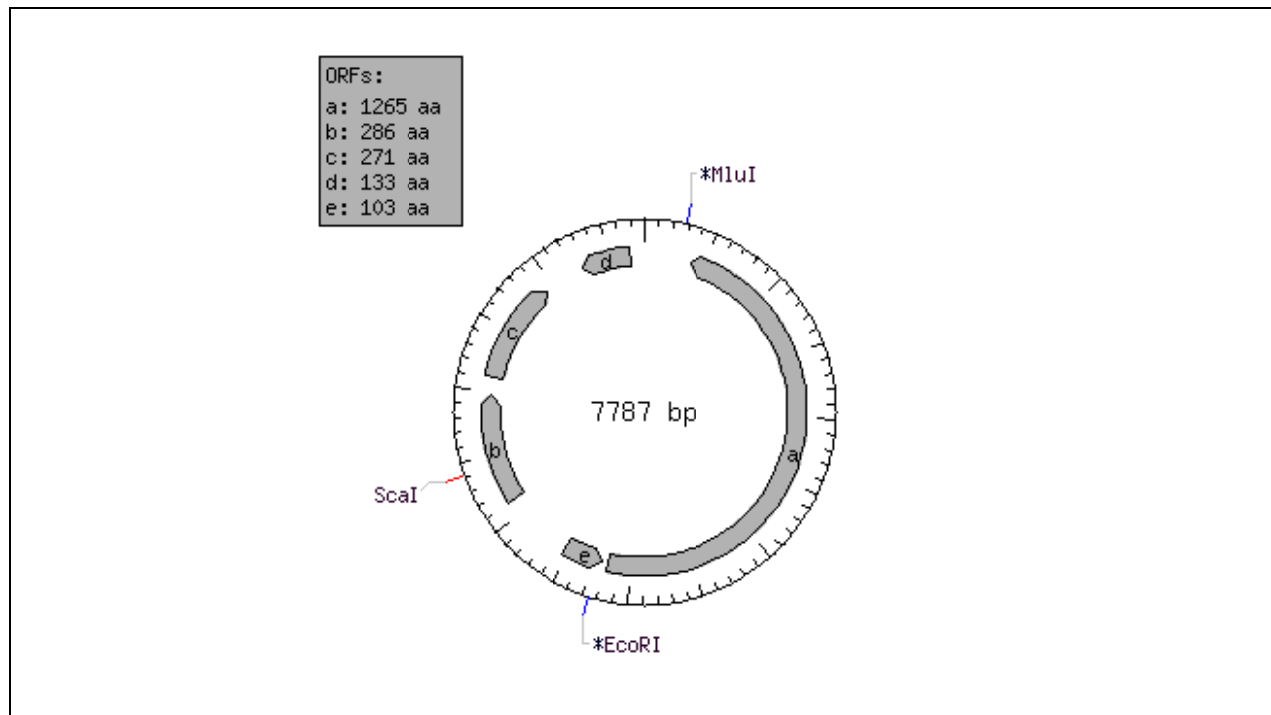


Abb. 3.34 pDrive-cFlightless-I-Plasmid

Durch das anschließende Ligieren des linearisierten pbeta-Aktin-EGFP und der „full length“ von *cFlightless-I* entstand das gesuchte Überexpressionsplasmid mit 10239bp (Abb. 3.35).

Das fertige Konstrukt wurde mit Hilfe von BamHI auf seine Exaktheit überprüft und wie geplant ergaben sich in der Restriktion vier Banden mit den Größen 4893bp, 2952bp, 1363bp und 1031bp (Abb. 3.36).

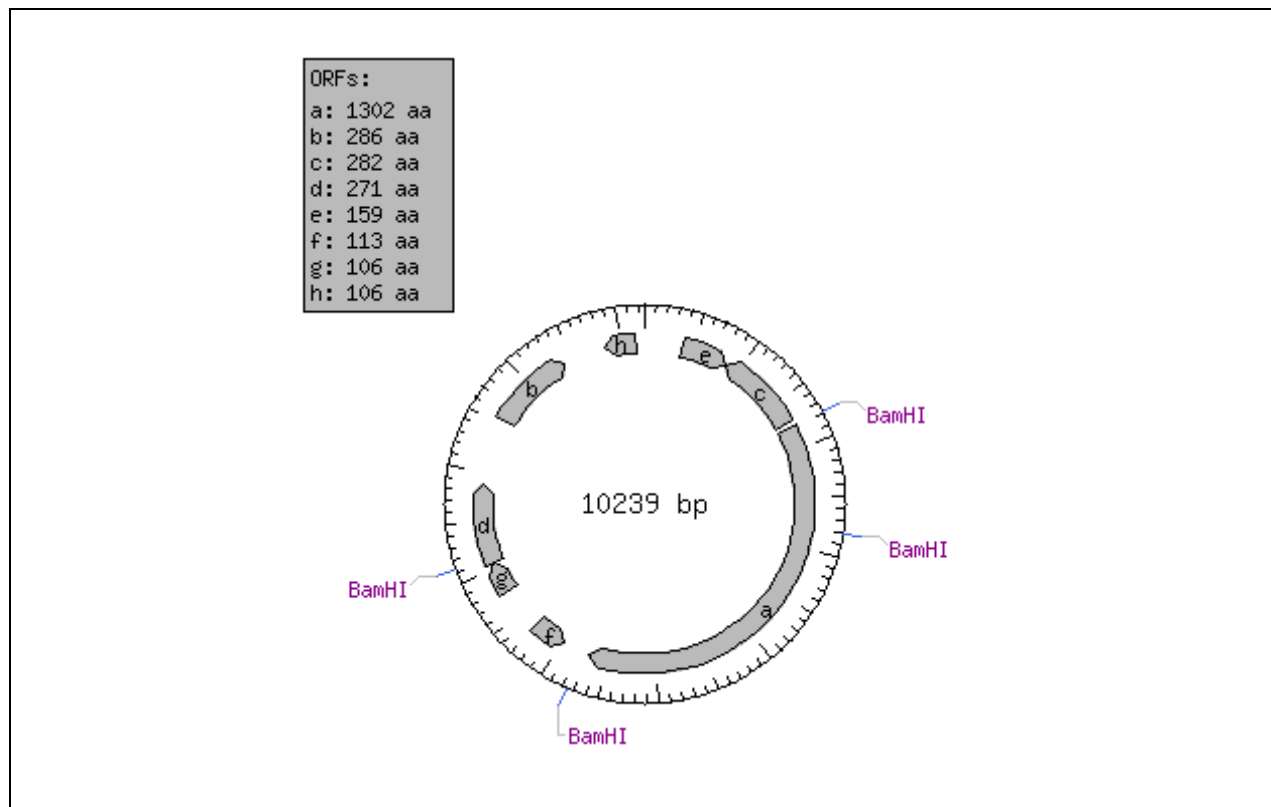


Abb. 3.35 Gesuchtes Überexpressionsplasmid von *Flightless-I*

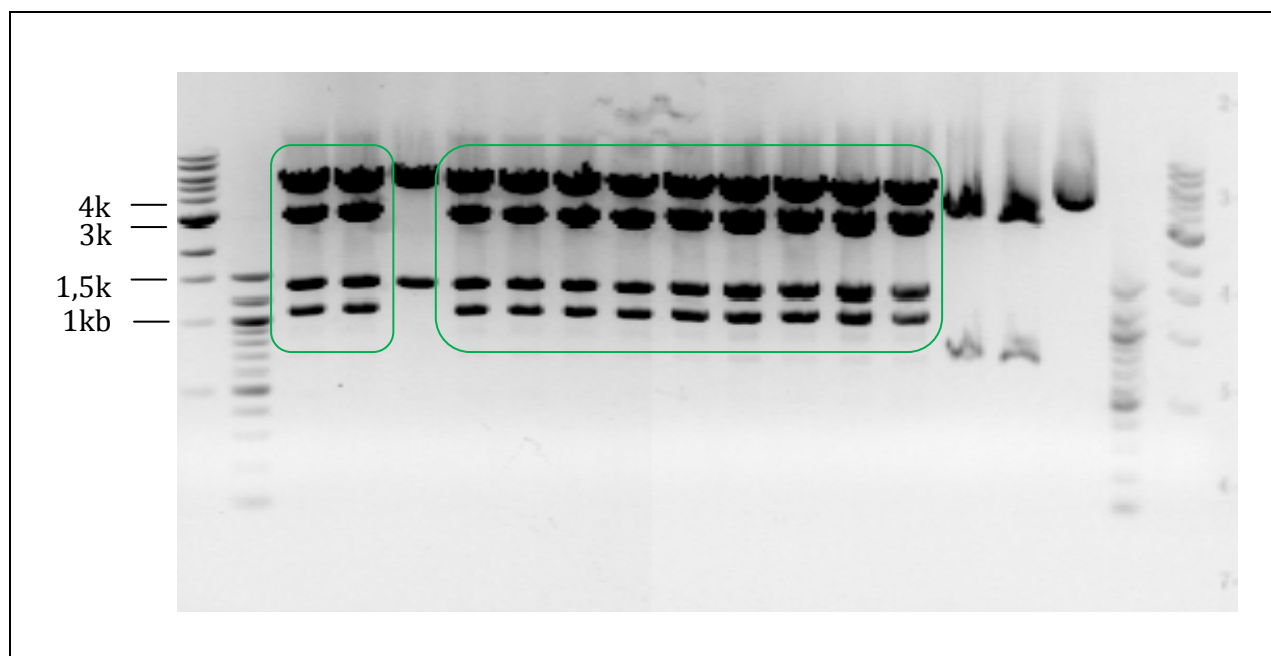


Abb. 3.36 Positive Klone des Überexpressionskonstruktes nach Zerlegung mit BamHI. Von 12 gepickten Klonen erwiesen sich 11 als positiv.

### 3.3.2 Überexpression von *Flightless-I*

Mit der Technik der Elektroporation wurde das neu gewonnene Überexpressionsplasmid in den Embryo eingebracht und die Ergebnisse anschließend mit Hilfe der Fluoreszenzdetektion und In-situ-Hybridisierung überprüft.

Zuerst musste das Überexpressionskonstrukt auf seine Funktionalität überprüft werden. Hierfür wurde nach erfolgreicher Elektroporation eine In-situ-Hybridisierung mit *Flightless-I* selbst durchgeführt. Das Ergebnis war eine sehr deutliche und starke Hochregulierung von *Flightless-I* in den elektroporierten Bereichen.

Das Konstrukt wurde in die caudalen Somiten und das Neuralrohr eingebracht. Die verwendeten Embryonen befanden sich hierfür in Stadium HH17. Zielort der Elektroporation war vor allem das mediale Dermomyotom wegen seiner Beteiligung bei der Myogenese.

Bildtafel 3.37 veranschaulicht die Ergebnisse nach Elektroporation und In-situ-Hybridisierung mit *Flightless-I*.

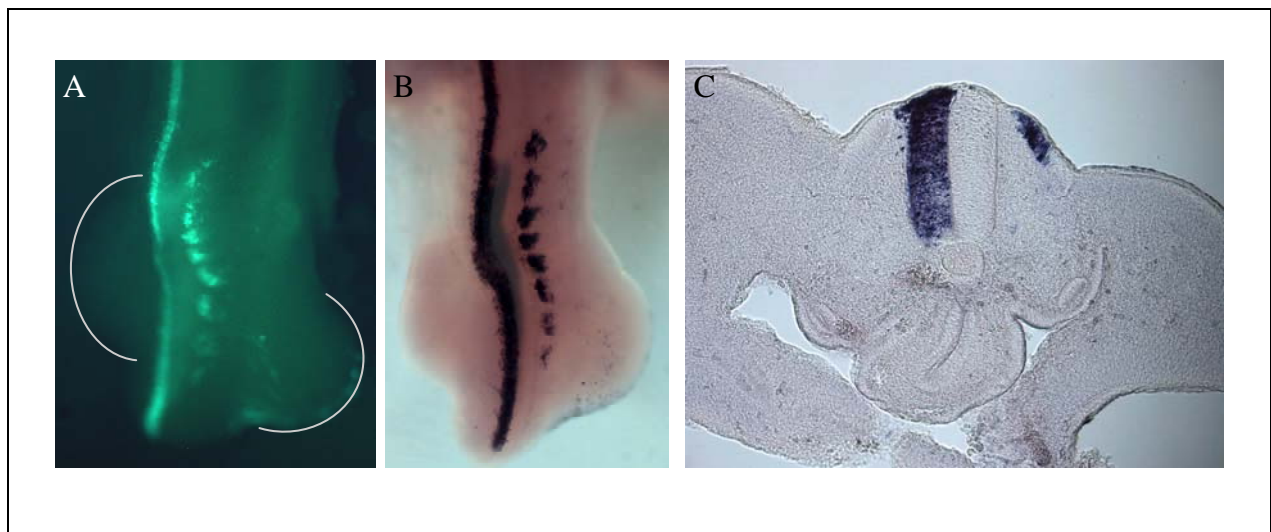


Abb. 3.37 *Fli-I*

A: Fluoreszenzbild nach erfolgreicher Elektroporation

B: Elektroporierter Embryo nach ISH mit *Flightless-I*

C: Querschnitt durch den operierten Embryo nach ISH mit *Flightless-I*

Abbildung 3.37.A zeigt die Fluoreszenzemission des Überexpressionsplasmids nach erfolgreicher Elektroporation. Das Konstrukt wurde in die caudalen Somiten und das Neuralrohr eingebracht. (Grau markierte Bereiche zeigen die Positionen der Hinterbeine.)

Abbildung 3.37.B veranschaulicht die Hochregulierung von *Flightless-I* nach In-situ-

Hybridisierung. Die Hochregulierung zeigt sich genau in den Bereichen, in die das Konstrukt eingebracht worden war.

Nach Deckungsgleichheit der Fluoreszenzbilder mit der In-situ-Hybridisierung konnte im Querschnitt gezeigt werden, dass auch die gewünschte Zielregion, das mediale Dermomyotom, getroffen wurde (Abbildung 3.37.C).

Im Folgenden wurde der Einfluss der Überexpression auf verschiedene Entwicklungsfaktoren untersucht.

Die Muskelentwicklungsfaktoren *MyoD*, *Myogenin* und *Myf5* erfuhren nach Überexpression von *Flightless-I* eine Herunterregulierung, wohingegen bei den Entwicklungsfaktoren *Cdc42* und *Pax3* eine deutliche Hochregulierung beobachtet werden konnte.

Alle verwendeten Embryonen befanden sich zum Zeitpunkt der Elektroporation in den Stadien HH16-HH19. Die Fluoreszenzaufnahmen nach erfolgter Elektroporation wurden nach 20 Stunden Inkubation im Brutschrank getätigt.

### 3.3.2.1 Effekt der Überexpression auf *MyoD*

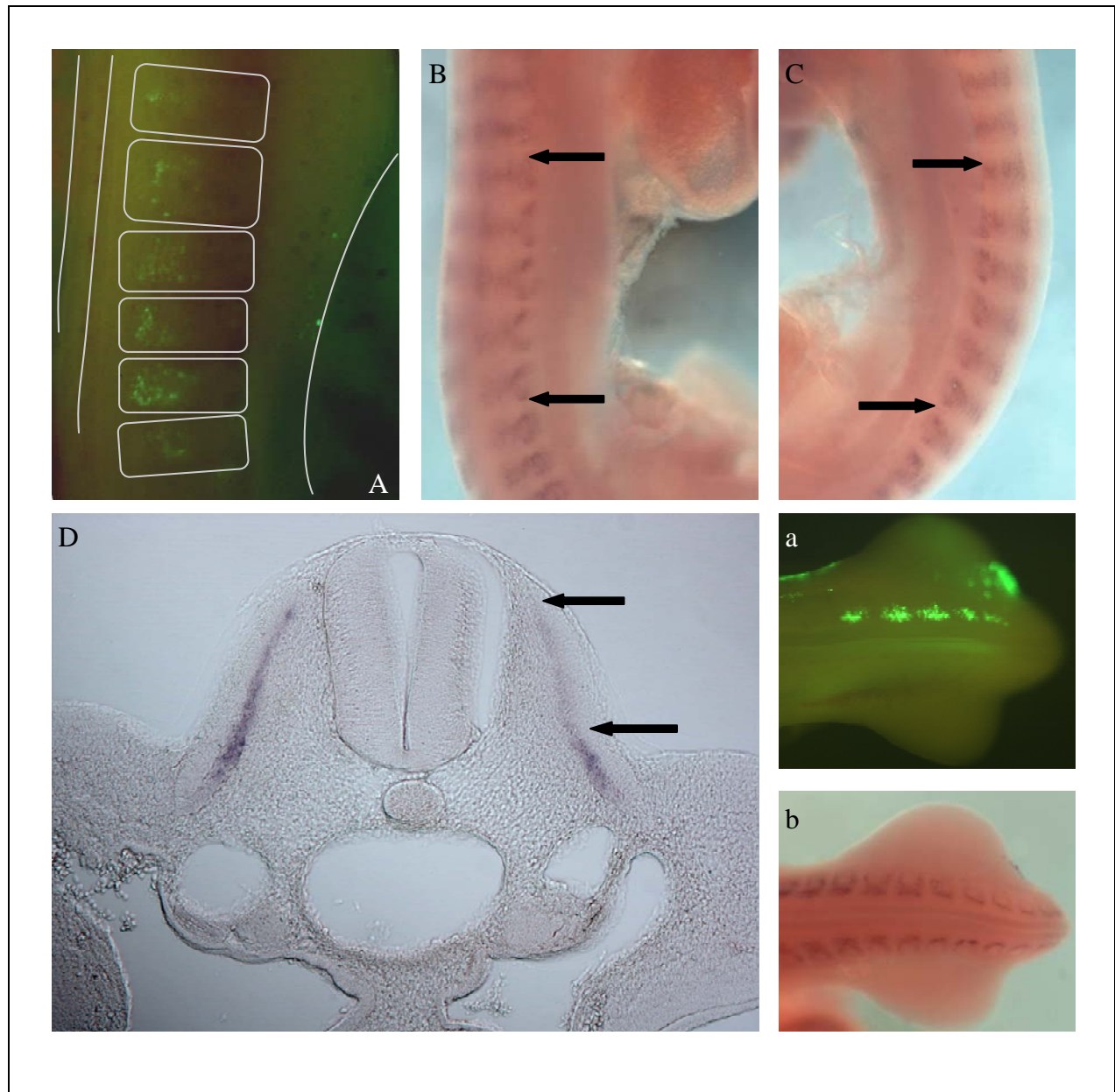


Abb. 3.38 *Myo D*

A: Fluoreszenzbild nach erfolgreicher Elektroporation

B: Elektroporierte Seite nach ISH mit *Myo D*

C: Kontrollseite nach ISH mit *Myo D*

D: Querschnitt durch den operierten Embryo nach ISH mit *Myo D*

a: Mit Kontroll-EGFP elektroporierter Embryo

b: Kontrollembryo nach ISH mit *MyoD*

In der Abbildung 3.38.A ist deutlich die Fluoreszenzemission des eingebrachten Überexpressionsplasmids im dorsomedialen Quadranten der Somiten zu erkennen. Sechs Somiten



zeigen Fluoreszenz (weiße Linie rechts zeigt die Lage der Vorderbeinleiste an, weiße Rechtecke markieren die Grenzen der Somiten, weiße parallele Linien links verdeutlichen den Verlauf des Neuralrohrs).

Abbildung 3.38.B zeigt denselben Embryo nach In-situ-Hybridisierung mit *MyoD*. Die beiden schwarzen Pfeile markieren den elektroporierten Bereich, der nach der In-situ-Hybridisierung eine deutliche Herunterregulierung des *MyoD*-Signals aufweist.

In der Abbildung 3.38.C ist derselbe Embryo von der linken, nicht elektroporierten Kontrollseite gezeigt. Hier ist die Expression von *MyoD* in allen Somiten gleichmäßig zu sehen.

Abbildung 3.38.D präsentiert einen Querschnitt durch den operierten Embryo. Bei Vergleich der beiden Seiten ist rechts eine deutliche Herunterregulierung des *MyoD*-Signals im dorso-medialen Bereich des Somiten zu erkennen (schwarze Pfeile).

Die Abbildung 3.38a zeigt einen Kontrollembryo nach Elektroporation mit einem leeren EGFP-Vektor. Nach anschließender ISH mit *MyoD* (Abbildung 3.38b) ist keine Herunterregulierung zu erkennen.

### 3.3.2.2 Effekt der Überexpression auf *Myf5*

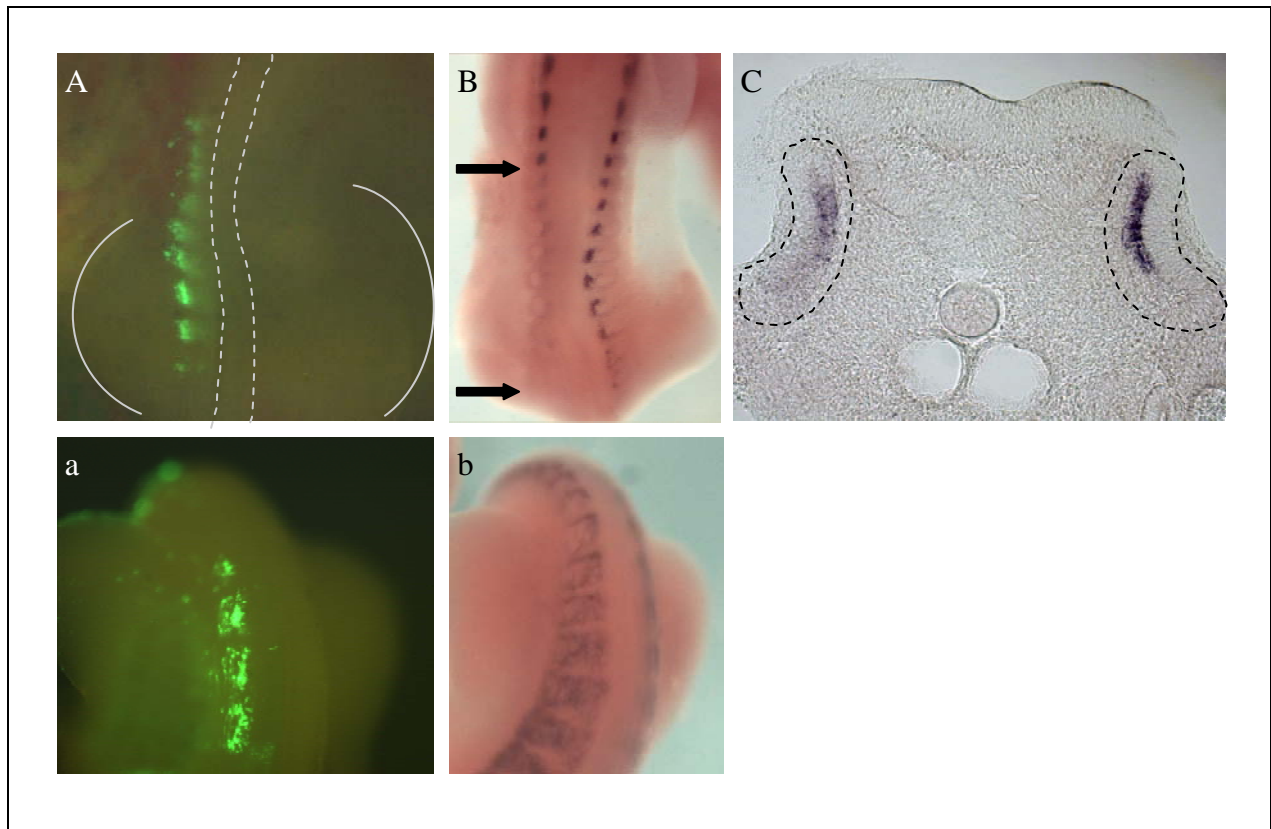


Abb. 3.39 *Myf5*

A: Fluoreszenzbild nach erfolgreicher Elektroporation. Die Fluoreszenzemission ist in 9 Somiten zu sehen.

B: Embryo nach ISH mit *Myf5*. Elektroporierte Seite und Kontrollseite.

C: Querschnitt durch den operierten Embryo nach ISH mit *Myf5*

a: Mit Kontroll-EGFP elektroporierter Embryo

b: Kontrollembrryo nach ISH mit *Myf5*

Abbildung 3.39.A zeigt auf der linken Seite die Fluoreszenz des Konstruktes in neun Somiten (weiße, gestrichelte Linien in der Mitte stellen den Verlauf des Neuralrohres dar, die weißen Halbkreise rechts und links veranschaulichen die Lage der Hinterbeine).

Die Abbildung 3.39.B präsentiert denselben Embryo nach In-situ-Hybridisierung mit *Myf5*. Auf der linken, elektroporierten Seite ist deutlich eine starke Herunterregulierung des Signals von *Myf5* zu sehen. Die rechte Kontrollseite exprimiert das Signal von *Myf5* gleichmäßig ohne Abschwächung.

In der Abbildung 3.39.C ist ein Querschnitt durch den Embryo gezeigt. Der Seitenvergleich verdeutlicht die starke Herunterregulierung des Signals von *Myf5* im dorsomedialen Bereich

des linken Somiten (gestrichelte schwarze Linien zeigen die Grenze der Somiten).

Die Abbildung 3.39a zeigt einen Kontrollembryo nach Elektroporation mit einem leeren EGFP-Vektor. Nach anschließender ISH mit *Myf5* (Abbildung 3.39b) ist keine Herunterregulierung zu erkennen.

### 3.3.2.3 Effekt der Überexpression auf *Myogenin*

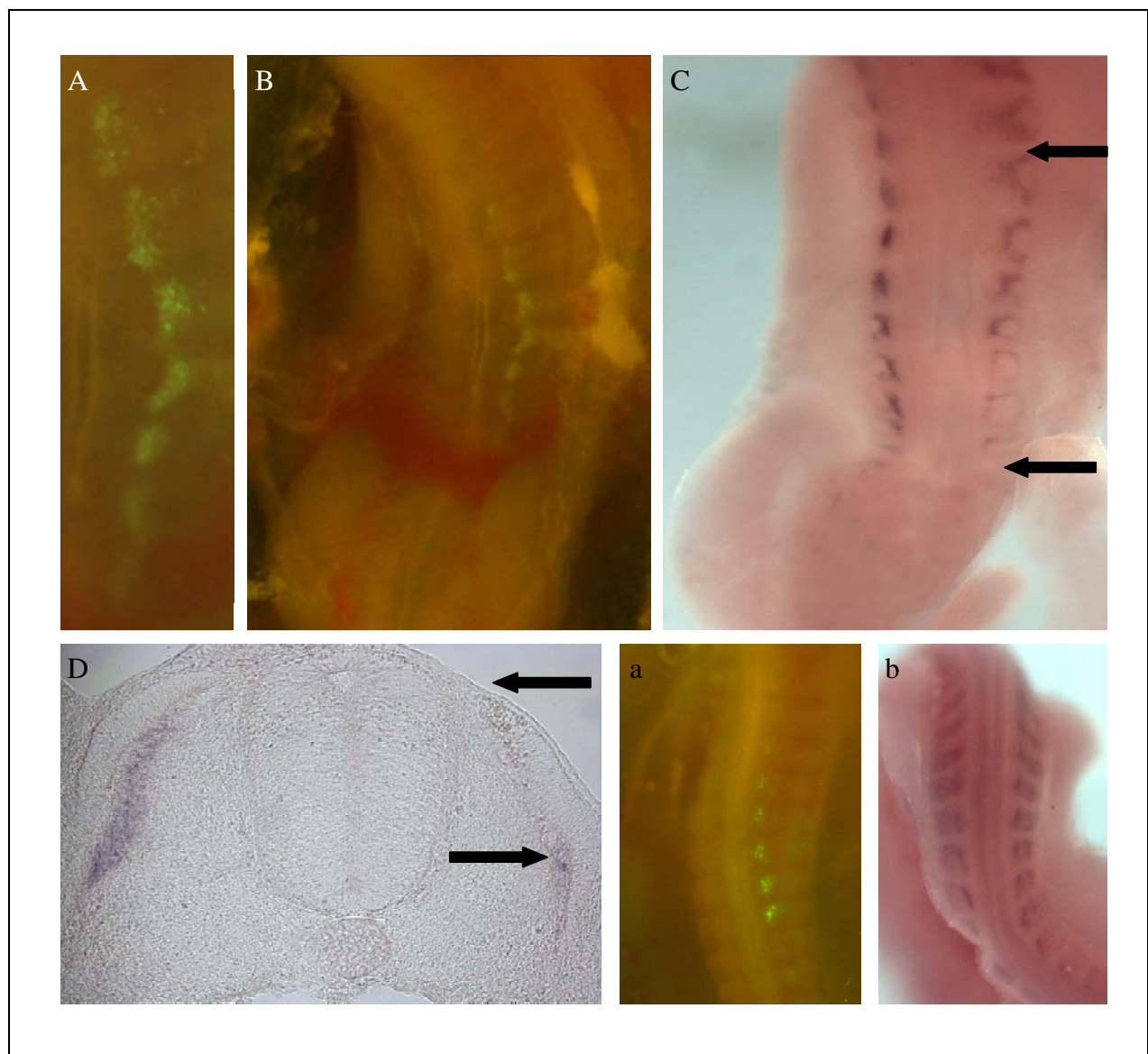


Abb. 3.40 *Myogenin*

A: Fluoreszenzbild nach erfolgreicher Elektroporation (Nahaufnahme)

B: Fluoreszenzbild Übersicht

C: Embryo nach ISH mit *Myogenin*

D: Querschnitt durch den operierten Embryo

a: Mit Kontroll-EGFP elektroporierter Embryo

b: Kontrollembryo nach ISH mit *Myogenin*

Die Abbildungen 3.40.A und B zeigen die Lokalisation des Überexpressionskonstruktes im medialen Teil der Somiten, parallel des Neuralrohrs, nach erfolgreicher Elektroporation. Die Elektroporation erfolgte auf der rechten Seite.

In der Abbildung 3.40.C wird deutlich, dass nach In-situ-Hybridisierung mit *Myogenin* auf der operierten, rechten Seite eine klare Herunterregulierung zu beobachten ist. Im Vergleich dazu die nicht operierte linke Seite. Links findet sich keinerlei Abschwächung des Signals.

In Abbildung 3.40.D ist derselbe Embryo im Querschnitt gezeigt. Im dorsomedialen Anteil des rechten Somiten verliert sich das Signal von *Myogenin* (schwarze Pfeile).

Die Abbildung 3.40a zeigt einen Kontrollembryo nach Elektroporation mit einem leeren EGFP-Vektor. Nach anschließender ISH mit *Myogenin* (Abbildung 3.40b) ist keine Herunterregulierung zu erkennen.

#### 3.3.2.4 Effekt der Überexpression auf *Pax3*

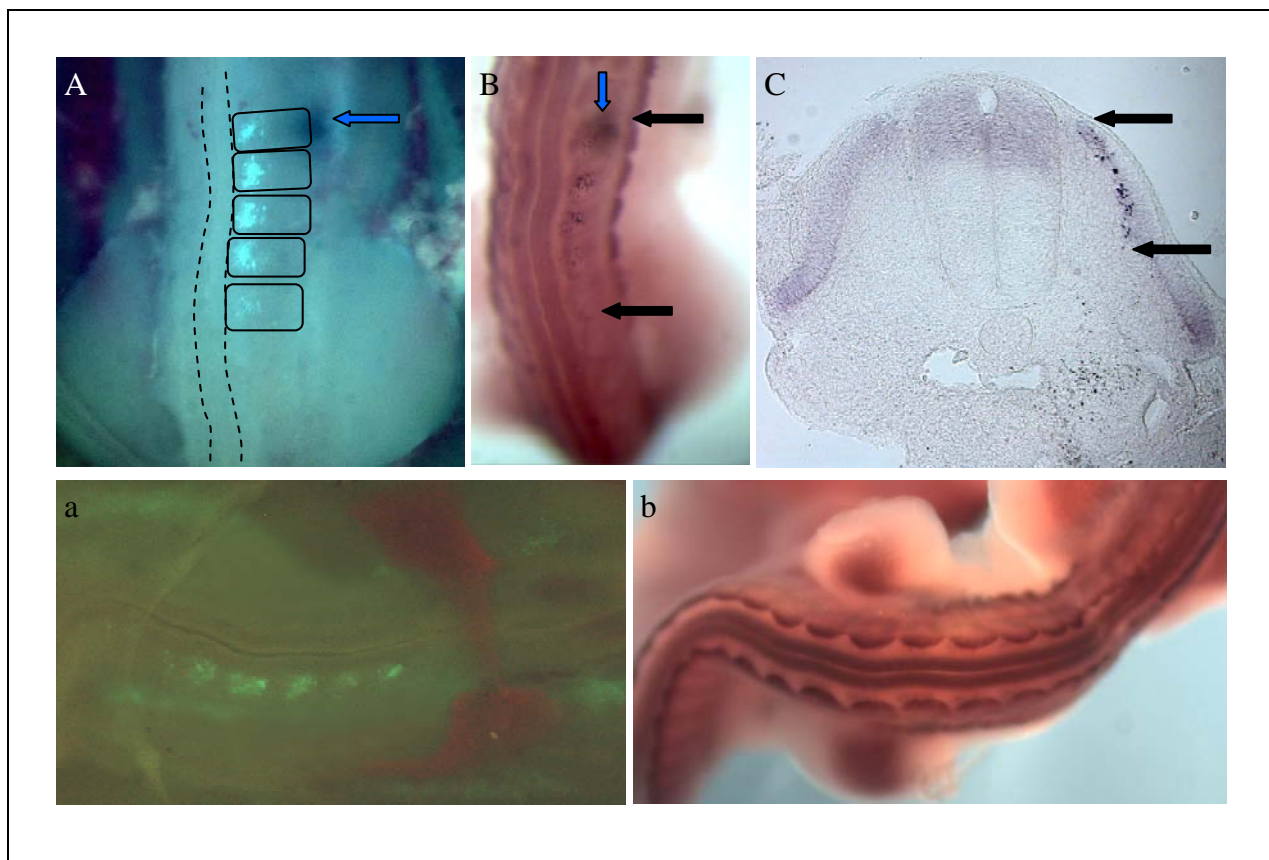


Abb. 3.41 *Pax3*

A: Fluoreszenzbild nach erfolgreicher, rechtsseitiger Elektroporation

B: Derselbe Embryo nach ISH mit *Pax3*

C: Querschnitt durch den operierten Embryo

a: Mit Kontroll-EGFP elektroporierter Embryo

b: Kontrollembryo nach ISH mit *Pax3*

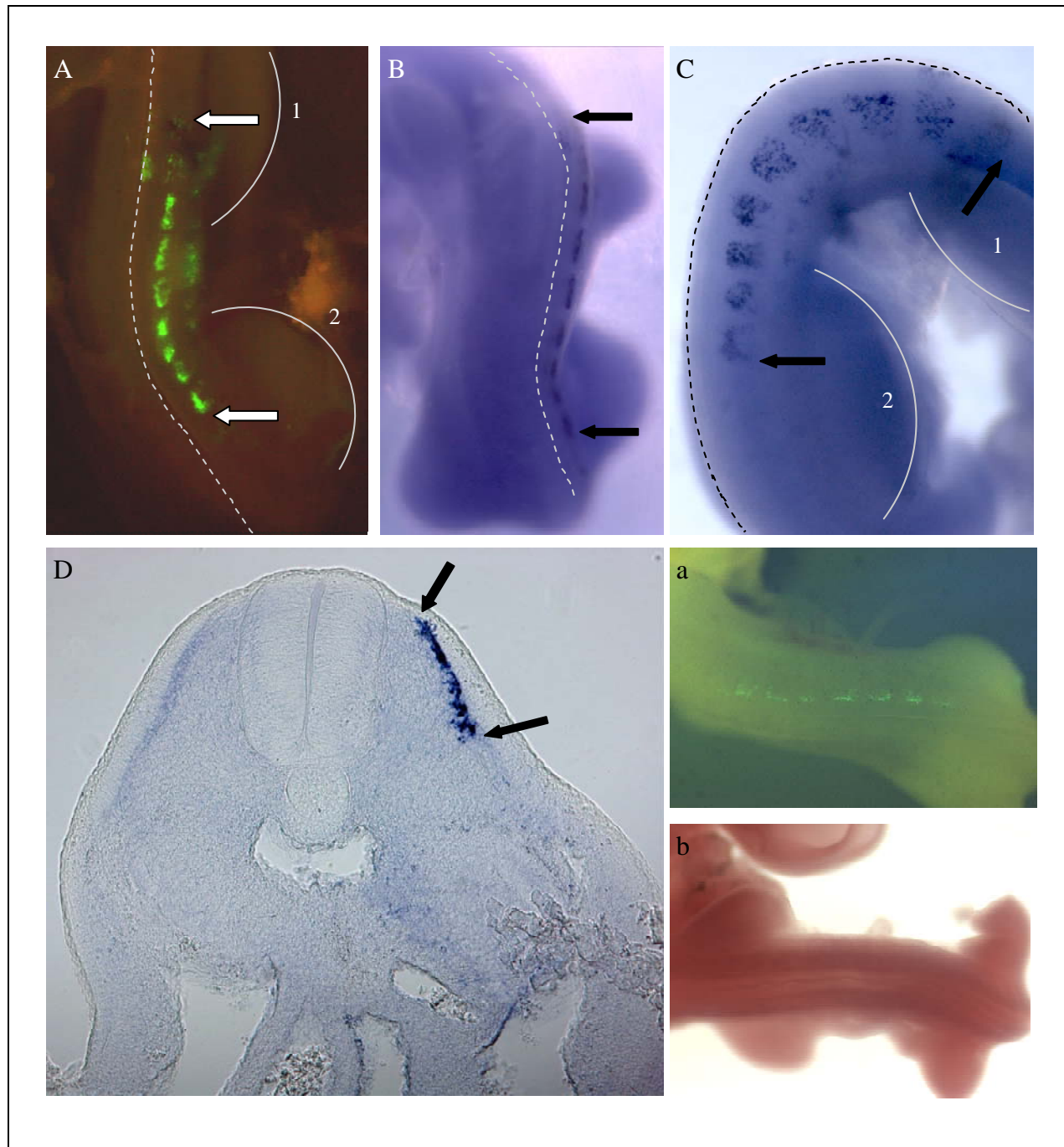
In der Abbildung 3.41.A ist das Fluoreszenzsignal des Konstruktes in fünf Somiten zu erkennen. (Der blaue Pfeil markiert einen Tintenfleck der sich während der Operation in der ektodermalen Oberfläche eingelagert hat.)

Die Abbildung 3.41.B veranschaulicht das Ergebnis der In-situ-Hybridisierung mit *Pax3*. Auf der operierten, rechten Seite zeigt sich eine klare Hochregulierung des Signals von *Pax3*. Der blaue Pfeil markiert den Tintenfleck, der bereits im Fluoreszenzbild vorhanden war und verdeutlicht somit die Deckungsgleichheit zwischen beiden Bildern. Die mittleren drei Somiten zeigen das Signal klar und deutlich, während im caudalsten Somiten das Signal nur vereinzelt zu erkennen ist, was wiederum mit dem zarten Fluoreszenzsignal in diesem Somiten übereinstimmt. Im cranialsten Somiten verdeckt der Tintenfleck teilweise das vorhandene Signal.

Abbildung 3.41.C präsentiert denselben Embryo nach Anfertigung eines Querschnittes durch den elektroporierten Bereich. In der dorsomedialen Hälfte des Somiten ist deutlich die starke Hochregulierung des Signals von *Pax3* zu erkennen.

Die Abbildung 3.41a zeigt einen Kontrollembryo nach Elektroporation mit einem leeren EGFP-Vektor. Nach anschließender ISH mit *Pax3* (Abbildung 3.41b) ist keine Hochregulierung zu erkennen.



3.3.2.5 Effekt der Überexpression auf *Cdc42*Abb. 3.42 *Cdc42*

A: Fluoreszenzbild nach erfolgreicher Elektroporation

B: Derselbe Embryo nach ISH mit *Cdc42* (Effekt- und Kontrollseite)

C: Seitliche Aufnahme des Embryo nach ISH mit *Cdc42*

D: Querschnitt durch den operierten Embryo

(gestrichelte Linien: Verlauf des Neuralrohrs; 1: Vorderbein bzw. Flügel; 2: Hinterbein)

a: Mit Kontroll-EGFP elektroporierter Embryo

b: Kontrollembrryo nach ISH mit *Cdc42*



In der Abbildung 3.42.A zeigt sich auf der rechten Seite des Embryos deutlich die Fluoreszenzemission des eingebrachten Überexpressionskonstruktes im medialen Teil von neun Somiten (weiße Pfeile).

Abbildung 3.42.B zeigt denselben Embryo nach In-situ-Hybridisierung mit *Cdc42*. Das Bild präsentiert gleichzeitig Effektseite (rechts) und Kontrollseite (links). Die deutliche Hochregulierung von *Cdc42* ist in neun Somiten zu erkennen. Dies wird durch die seitliche Aufnahme in Abbildung 3.42.C noch verstärkt (schwarze Pfeile).

Der Querschnitt (Abbildung 3.42.D) veranschaulicht die starke Hochregulierung im dorso-medialen Bereich des rechten Somiten.

Die Abbildung 3.42a zeigt einen Kontrollembryo nach Elektroporation mit einem leeren EGFP-Vektor. Nach anschließender ISH mit *Cdc42* (Abbildung 3.42b) ist keine Hochregulierung zu erkennen.

### 3.3.2.6 Grafische Zusammenfassung der aufgetretenen Effekte

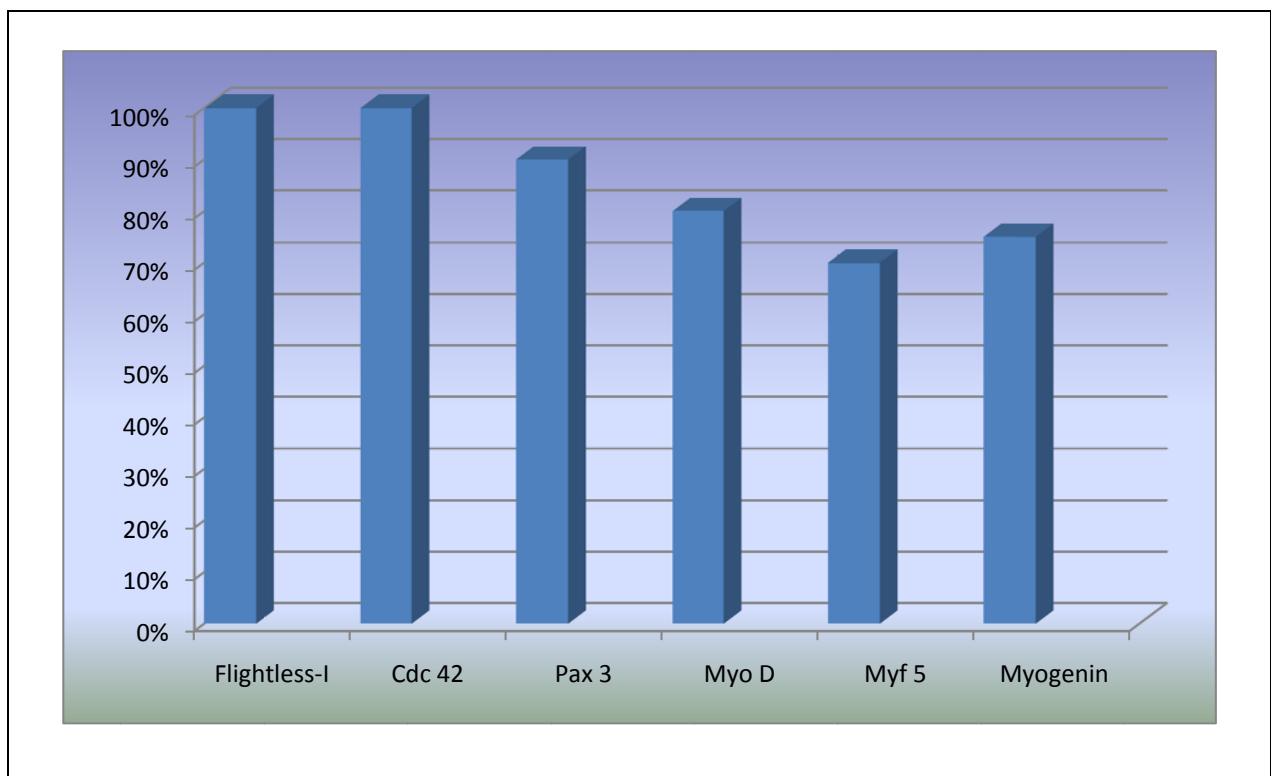


Abb. 3.43 Grafische Darstellung der Überexpressionsergebnisse nach In-situ-Hybridisierung

Die Grafik 3.43 veranschaulicht die aufgetretenen Effekte der Hoch- und Herunterregulierung in Prozent. Bei der In-situ-Hybridisierung mit *Flightless-I* und *Cdc42* zeigte jeder untersuchte Embryo zu 100% eine sehr starke Hochregulierung. Getestet wurden in beiden Fällen 8 Embryonen. Bei der ISH mit *Pax3* zeigten alle Embryonen, bei denen die ISH funktioniert hatte, eine klare Hochregulierung. Bei 10% der Embryonen hatte die Färbung der ISH jedoch nicht funktioniert. Außerdem war der Effekt nicht so deutlich wie bei *Flightless-I* und *Cdc42*, weshalb eine größere Anzahl von 30 Embryonen getestet wurde. Da die Herunterregulierung in den Muskelentwicklungsfaktoren in ihrer Intensität einer leichten Schwankung unterlag, wurde auch hier entschieden, zur Sicherheit eine größere Anzahl von 30 Embryonen zu testen.

Bei *MyoD* zeigten 24 von 30 Embryonen eine klar erkennbare Herunterregulierung, wohingegen bei 3 Embryonen kein Effekt zu sehen war, ein Embryo keine Färbung aufwies und zwei Embryonen augenscheinlich eine Hochregulierung zeigten. Nach der ISH mit *Myogenin* kam es in 23 von 30 Embryonen zu einer klaren Herunterregulierung, 7 Embryonen zeigten keinen Effekt. 21 von 30 Embryonen wiesen nach der ISH mit *Myf5* eine klare Herunterregulierung auf. Bei 7 Embryonen war kein Effekt zu sehen und 2 der Embryonen wurden während des Versuchs zerstört und waren deshalb unbrauchbar.

### 3.3.2.7 Morphologische Veränderungen nach Überexpression von *Flightless-I*

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Überexpression von *Flightless-I* fiel besonders bei der Betrachtung der Fluoreszenzaufnahmen und auch in den Bildern post ISH, in denen es zu einer Hochregulierung gekommen war, auf, dass in den untersuchten Somiten kaum elongierte Muskelfasern zu sehen waren. Daher erschien es sinnvoll, auch die Morphologie näher zu betrachten. Mit Hilfe von Antikörperfärbungen wurden sowohl Kryoschnitte als auch Vibratomschnitte untersucht.

Tatsächlich konnte durch den Vergleich von Elektroporationen mit dem Überexpressionskonstrukt und Elektroporationen mit einem leeren Vektor, der lediglich EGFP enthielt, festgestellt werden, dass nach Überexpression von *Flightless-I* kaum elongierte Muskelfasern zu finden waren. Die Zellen wiesen eine abgekugelte, runde Gestalt auf, während die Zellen, die mit dem leeren EGFP-Vektor bearbeitet worden waren, langgestreckte, elongierte Fasern zeigten (Abbildung 3.44). Um sicher zu gehen, dass die Muskelfasern in ihrer Entwicklung weit genug waren, wurden einige der Embryonen nicht wie üblich nach der Operation 20 Stunden sondern 48 Stunden inkubiert. Aber auch hier zeigte der Vergleich zwischen dem Überexpressionskonstrukt und dem leeren EGFP-Vektor klar und deutlich, dass die Zellen nach Bearbeitung mit *Fli-I* eine Kugelgestalt annahmen, während gleichaltrige Zellen, die mit dem leeren Vektor operiert worden waren, elongierte Muskelfasern erkennen ließen.

In der folgenden Bildtafel 3.44 sind die Ergebnisse des Vergleichs dargestellt. Auf der linken Seite, mit Großbuchstaben gekennzeichnet, befinden sich die mit dem *Flightless-I*-Überexpressionskonstrukt operierten Embryonen, während auf der rechten Seite, mit Kleinbuchstaben versehen, die Ergebnisse der Elektroporation mit dem leeren EGFP-Vektor dargestellt sind.

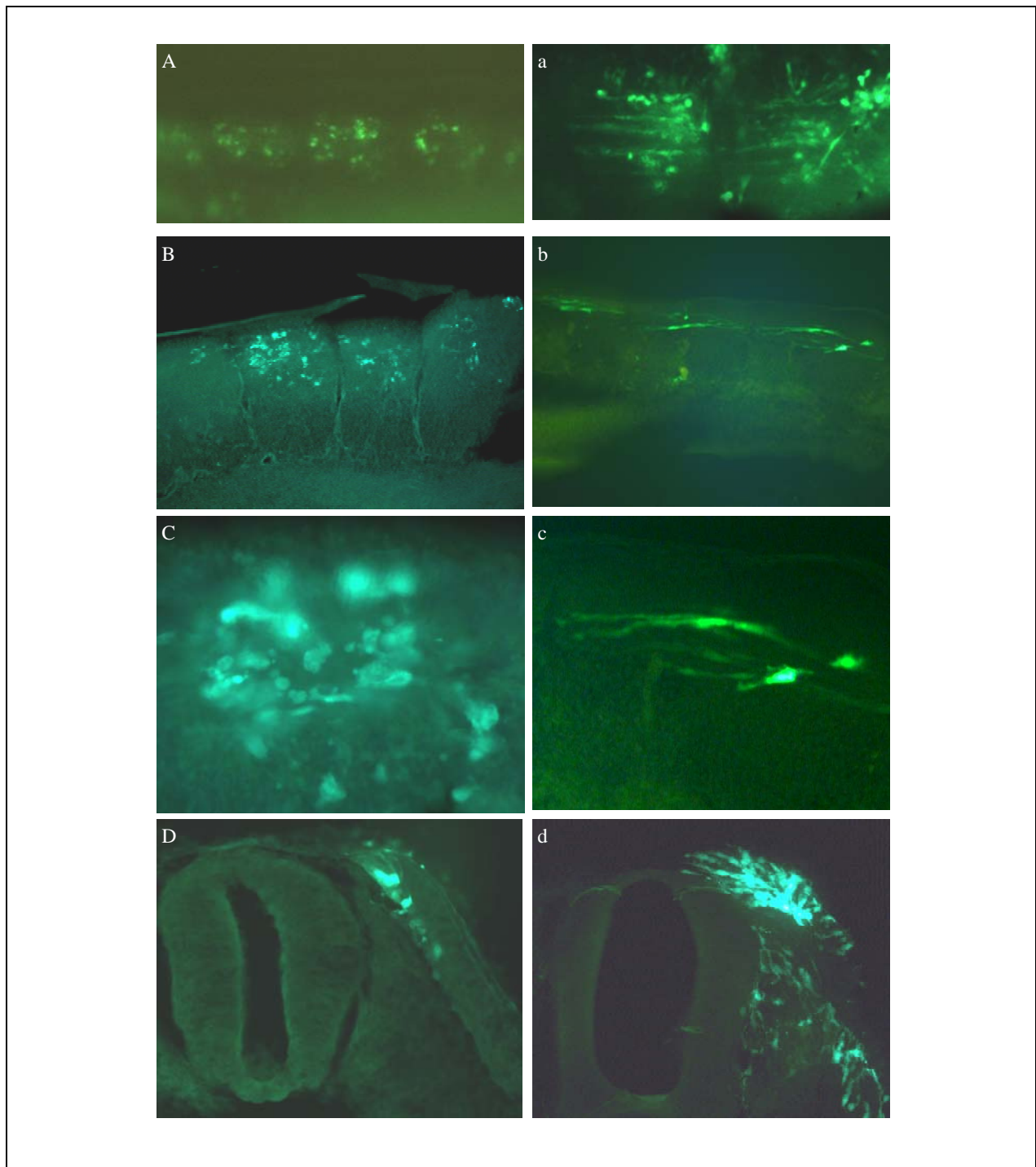


Abb. 3.44 *Fli-I* Morphologie (linke Spalte mit Großbuchstaben: *Fli-I*-Überexpressionskonstrukt; rechte Spalte

---

mit Kleinbuchstaben: leerer EGFP-Vektor), Abbildung b und c zur Verfügung gestellt von S. Philippi.

Die Abbildungen 3.44.A und a zeigen jeweils Fotografien von „Whole mounts“. In A sind deutlich die abgekugelten, runden Zellen ohne jegliche Ausbildung von Längsfasern zu erkennen, während in Abbildung a neben rundlichen Zellhaufen deutliche Faserbildung in cranio-caudaler Richtung zu vermerken ist.

In den Abbildungen 3.44.B und b sind sagittale Längsschnitte dargestellt und in 3.44.C und c deren jeweilige Vergrößerung. Genau wie in den „Whole mounts“ kann auch in den Schnitten die Kugelform der Zellen nach Elektroporation mit *Fli-I* beobachtet werden, wohingegen sich im Kontrollbild mit EGFP die einzelnen Zellen elongiert darstellen.

Abschließend präsentieren die Abbildungen 3.44.D und d Querschnitte. In der rechten dorsomedialen Lippe des Dermomyotoms zeigt sich ebenso wie in den vorhergehenden Abbildungen ein klarer Unterschied zwischen elongierten Zellen und der „*Flightless-I*-Kugelform“.

### 3.3.2.8 Test auf Zelluntergang

Um auszuschließen, dass die Effekte der Hoch- und Herunterregulierung sowie die morphologischen Veränderungen auf Zelluntergänge im Zuge der Elektroporation zurückzuführen sind, wurde ein Test auf Zelluntergang mittels Nilblausulfatfärbung durchgeführt. Die Abbildung 3.45.A zeigt einen Embryo nach erfolgreicher Elektroporation mit dem Überexpressionskonstrukt von *Flightless-I*. Drei Somiten zeigen Fluoreszenz. In der Abbildung 3.45.B ist derselbe Embryo nach Färbung mit Nilblausulfat dargestellt. Im Seitenvergleich zwischen elektroporierter und nicht operierter Seite zeigt sich, dass in den elektroporierten Somiten keine vermehrten Ansammlungen von Nilblausulfat zu finden sind. Somit ist mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit auszuschließen, dass die gefundenen Effekte auf die Hitzeentwicklung der Elektroporation zurückzuführen sind.

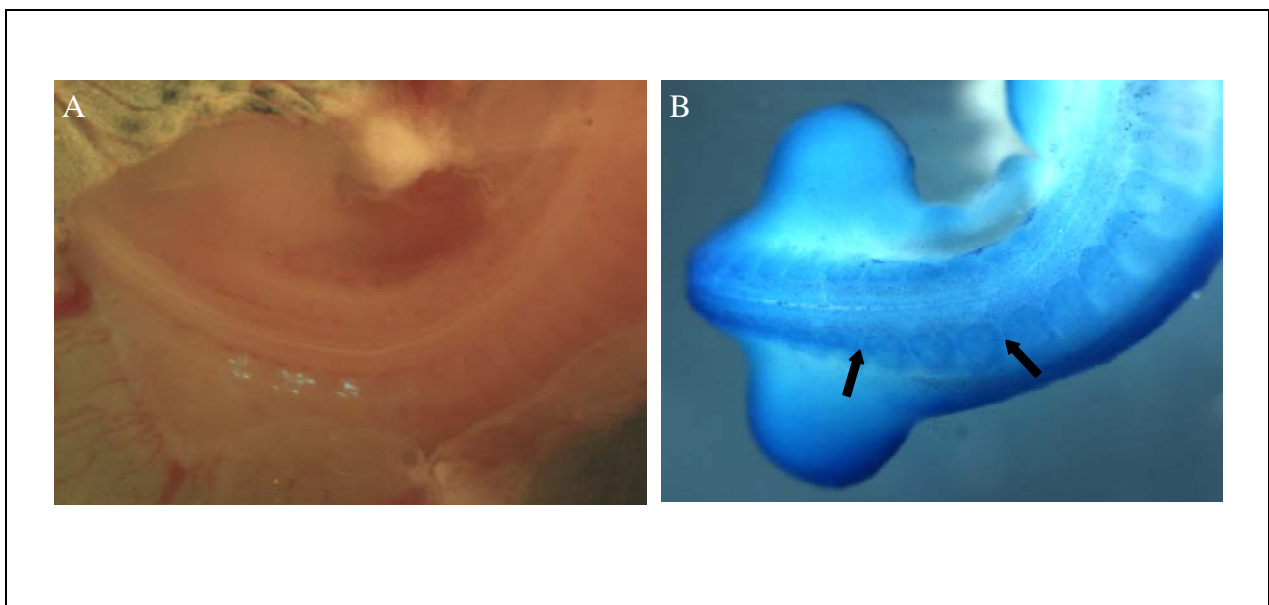


Abb. 3.45 Test auf Zelluntergang

Abbildung A: Fluoreszenzbild nach erfolgreicher Elektroporation mit dem Überexpressionsplasmid von *Flightless-I* (1: Hinterbein)

Abbildung B: Färbung desselben Embryos mit Nilblausulfat. Die schwarzen Pfeile markieren die Somiten, in die zuvor die Elektroporation des Überexpressionskonstruktes erfolgt war.

### 3.3.2.9 Abschlussbemerkung

Abschließend ist zu sagen, dass die Überexpression von *Flightless-I* zu einer Herunterregulierung der Muskelentwicklungsfaktoren *MyoD*, *Myf5* und *Myogenin* bewirkt sowie eine Hochregulierung von *Cdc42* und *Pax3*. Zum anderen verhindert die Überexpression von *Flightless-I* die Elongation der Zellen. An Hand der Morphologie und der untersuchten Markermoleküle konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach Überexpression von *Flightless-I* in einem unreifen, nicht differenzierten Stadium verharren und nicht mehr in der Lage sind zu elongieren und Muskelfasern auszubilden. Durch das „Nichtelongieren“ der Myotomzellen wird die Myotomentwicklung bzw. -entstehung gestört und es kann kein regelrechtes Myotom gebildet werden.

## 4. Diskussion

Nachdem sich bei Untersuchungen zu *Drosophila melanogaster* interessante und breitgefächerte Parallelen zwischen den Aktin-bindenden Proteinen  $\beta$ -Thymosin/Ciboulot und Flightless-I gezeigt hatten sowie entsprechende Befunde für Thymosin beim Vogel vorlagen, war es nun das Ziel der hier vorgelegten Arbeit herauszufinden, welche Rolle *Flightless-I* im Hühnchen und somit im Wirbeltier zukommt.

Zum einen sollte die Expression im Hühnerembryo analysiert werden und zum anderen hoffte man, in einer Funktionsstudie mittels Überexpression, Aussagen über die Funktion von *Flightless-I* während der Myogenese zu erhalten. Gibt es eventuell Gemeinsamkeiten in der Rolle von *Thymosin $\beta$ -15* und *Flightless-I* während der Embryonalentwicklung? Und wenn dies der Fall ist, welche zellulären Prozesse liegen den Phänokopien nach Manipulation beider Gene zugrunde?

Mit diesen Untersuchungen geht auch die Hoffnung einher, neue Einblicke in Richtung der Aufklärung zytologischer Ursachen des Smith-Magenis-Syndroms zu gewinnen.

Die Untersuchungen, die bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* Flugunfähigkeit verursachen, führten in den späten 70er Jahren zur Entdeckung von Flightless-I, einem neuen Mitglied der Gelsolin-Superfamilie von Aktin-bindenden Proteinen (Homyk und Sheppard, 1977). Bei genetischen Analysen auf dem X-Chromosom der Fruchtfliege stellte sich heraus, dass sowohl lebensfähige als auch letale Allele auf dem „*Flightless-I*-Lokus“ existieren (Miklos und de Couet, 1990; Perrimon et al., 1989). Die lebensfähigen Allele sorgten für Flugunfähigkeit der Tiere, während die letalen Allele zu einem Absterben der Nachkommen im späten Larven- oder Puppenstadium führten. Lebensfähige, adulte Fliegen zeigten schwere Störungen der indirekten Flugmuskulatur. Die Z-Banden waren zerstört, eine Sarkomerstruktur war nicht mehr zu erkennen und die parallele Anordnung der Myofibrillen fehlte gänzlich (Miklos und De Couet, 1990). Bei der letalen Form starben die Embryonen infolge einer fehlerhaften Zellularisation im Blastodermstadium ab (Davy et al., 2000; Straub et al., 1996).

Diese Befunde bestätigten die Vermutung, dass *Flightless-I* eine Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts spielt. Darüber hinaus fanden sich zahlreiche Orthologe dieses Gens in Mensch, Maus und *C.elegans* (Campbell et al., 1993, 1997, 2000).

*Flightless-I* verbindet zwei bedeutende Proteinfamilien miteinander, nämlich die Aktin-bindende Gelsolin-Superfamilie mit der LRR-Superfamilie, welche in Protein-Protein-Interaktionen eingebunden ist. Diese duale Rolle macht *Flightless-I* für die Forschung zu einem Gegenstand von großem Interesse. Es wird vermutet, dass *Flightless-I* eine Brücke zwischen dem Aktinzytoskelett und bisher noch unidentifizierten Molekülen der Signaltransduktion schlägt (Claudianos und Campbell, 1995).



Gleichzeitig stellt *Flightless-I* mit einer großen Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von Mensch und *C.elegans* eines der am höchsten konservierten Gene dar (Archer et al., 2004). Diese Tatsache unterstreicht neben all den anderen die Wichtigkeit dieses Gens für den Organismus.

#### 4.1. Test auf Zelluntergang

Um auszuschließen, dass die gefundenen Effekte der Hoch- und Herunterregulierung der einzelnen Entwicklungsfaktoren Artefakte aufgrund untergegangener Zellen darstellen, wurde mit Hilfe einer Nilblausulfatlösung (Verdünnung 1:20000 in PBS) ein Test auf Zelluntergang durchgeführt (van den Eijnden et al., 1997).

Nach Elektroporation mit dem Überexpressionsplasmid und anschließender Färbung mit Nilblausulfat, zeigten sich in den elektroporierten Somiten keine vermehrten Ansammlungen an Nilblausulfat und es ließen sich somit keine vermehrten Zelluntergänge in diesen Bereichen erkennen (vgl. Kap. 3.3.2.8). In gewissem Umfang sind Zellzerstörungen, aufgrund des Eindringens der Glaskapillare in den Embryo und aufgrund der im Zuge der Elektroporation entstehenden Hitzeentwicklung, durchaus als normal anzusehen. Im Seitenvergleich zwischen elektroporierter und nicht operierter Seite lassen sich hier keine Areale mit vermehrten Zelluntergängen erkennen; und so kann mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit das Zustandekommen der Hoch- und Herunterregulierungen als Artefakte aufgrund von Hitze und mechanischer Zellschädigung ausgeschlossen werden.

#### 4.2. Asymmetrie im Hensenschen Knoten

*Flightless-I*, als Brückenglied zwischen der Aktin-bindenden Gelsolinsuperfamilie und der LRR-Superfamilie, reguliert in *Caenorhabditis elegans* aktinbasierte Vorgänge wie die Zytokinese somatischer Zellen, die anterior-posteriore Polarität und die asymmetrische Zellteilung (Deng et al., 2007). Es stellte sich heraus, dass in *Flightless-I*-Mutanten die asymmetrische Zellteilung der somatischen Zellen defekt war. Anstelle einer Tochterzelle und einer im multipotenten Stadium verharrenden Mutterzelle entstanden zwei gleichwertige Tochterzellen. Desweiteren kam es zu Schwierigkeiten bei der Ausbildung der anterior-posterioren Polarität und der Zytokinese im ersten mitotischen Zellzyklus (Deng et al., 2007).

In Säugetierzellen und *Xenopus*-Embryonen bindet LRRFIP2, ein menschliches Protein und Reaktionspartner von Flightless-I an der LRR-Domäne, das Protein Disheveled (dvl) und aktiviert so den „canonical Wnt pathway“, einen Signalweg, der für die Embryonalentwicklung sowie Achsenformation und Gewebebildung unerlässlich ist (Liu et al., 2005; Lee und Stallcup, 2006).

Neben der Wnt-gesteuerten Genexpression kam es in den *Xenopus*-Embryonen nach Injektion von LRRFIP2 zur Bildung einer zweiten Körperachse, die neben einem zweiten Neuralrohr und einem zweiten Notochord in ihrem Aufbau und Aussehen völlig identisch mit der primären Körperachse war (Liu et al., 2005). Auch *Flightless-I* spielt eine Rolle im Wnt-Signalweg. Nach Aktivierung des Wnt-Signalwegs kommt es zu einer  $\beta$ -Catenin abhängigen Transkription im Zellkern. Durch die exogene Zufuhr von FLAP1, einem Protein in der Maus und ebenfalls Reaktionspartner von *Flightless-I*, wird die  $\beta$ -Catenin-abhängige Transkription aktiviert, wohingegen sie durch *Fli-I* inhibiert wird. FLAP1 interagiert direkt mit  $\beta$ -Catenin, GRIP1 und p300 und verstärkt ihre Aktivität. Dabei arbeitet FLAP1 synergistisch mit p300, indem es die Transkriptionsaktivierung durch  $\beta$ -Catenin und LEF1/TCF unterstützt. *Flightless-I* hingegen unterbricht die Synergie von FLAP1 mit p300 und  $\beta$ -Catenin. Die entgegengesetzten Effekte von FLAP1 und *Fli-I* lassen eine wichtige Schlüsselrolle im Wnt-Signalweg vermuten (Lee und Stallcup, 2006).

Bei der Untersuchung der Expression von *Flightless-I* im Hühnerembryo zeigte sich, dass mit dem Auftreten des Hensenschen Knotens in Stadium HH05 *Flightless-I* auch dort exprimiert wird (vgl. Kap. 3.2.2.1). Hierbei wird deutlich, dass die Expression im Knoten auffallend asymmetrisch verläuft und eine der beiden Seiten stets stärker gefärbt ist als die andere, während das Zentrum grundsätzlich kein Signal aufweist. Die asymmetrische Färbung lässt sich bis Stadium HH08 verfolgen und verliert sich dann ab Stadium HH09. In Querschnitten durch den Primitivknoten konnte diese Asymmetrie jedoch nicht gezeigt werden.

Die asymmetrische Expression und die Verbindung von *Flightless-I* mit dem Wnt-Signalweg (Lee und Stallcup, 2006) lassen auch im Wirbeltier eine Rolle in der Ausbildung asymmetrischer Strukturen und anterior-posteriorer Ausrichtung vermuten (Deng et al., 2007). Nach momentanem Stand der Ergebnisse ist dies jedoch als spekulativ zu bewerten. Um genauere Aussagen darüber zu treffen, bedarf es weiterer eingehender Untersuchungen, beispielsweise durch Injektion von *Flightless-I*-RNA in aviäre Embryonen im Bereich des Hensenschen Knotens, um so durch Überexpressionsstudien eine etwaige Rolle von *Flightless-I* in der Ausbildung asymmetrischer Strukturen zu prüfen.

#### **4.3. Filopodien, Neuriten und Wachstumskegel**

Im Jahr 2000 gelang es (Davy et al., 2000), das *Flightless-I*-Protein in neuronalen Zellkörpern, in Neuriten und in deren Filopodien und Wachstumskegeln nachzuweisen.

Aus dem Zellkörper der Nervenzelle geht das Axon hervor. Das Wachstum von Nervenzellen wird durch sogenannte Wachstumsknoten geleitet. Diese bestehen aus Aktin-unterstützten Ausläufern, den Filopodien. Sie enthalten Rezeptoren, die für die Axonlenkung wichtig sind.

Vom Wachstumsknoten aus erfolgt die Elongation des Axons. Der Wachstumsknoten selbst gibt die Richtung vor und es können von dort ausgehend sowohl dünne Ausläufer, Filopodien, als auch dicke Ausläufer, Lamellopodien, entstehen. Die Vorwärtsbewegung der Wachstumsknoten beruht auf einem kontinuierlichen Umbau von Aktinfilamenten. Nach Depolymerisation am einen Ende, wandern freie Monomere zur Leitkante, an der es erneut zu Polymerisationsvorgängen und zur Zusammenlagerung von Aktinfilamenten kommt (Davy et al., 2000).

Flightless-I findet sich reichlich im neuronalen Zellkörper, entlang der Neuriten, im Hauptkörper der Wachstumsknoten und an der Spitze von Filopodien, die vom Wachstumsknoten aussprossen. Alle diese Strukturen sind stark von Aktinfilamenten durchzogen. In den neuronalen Strukturen zeichnet sich also eine Kolo-kalisation zwischen Flightless-I und Aktinfilamenten ab (Davy et al., 2000).

Das Expressionsmuster im Hühnchen zeigt die Anwesenheit von *Flightless-I* in sämtlichen neuronalen Strukturen des Hühnerembryos. Ausgehend von den frühen Stadien wird *Flightless-I* im kompletten Neuralrohr exprimiert. In den älteren Stadien findet sich eine deutliche Expression in Gehirn, Rückenmark und Ganglien.

In den Stadien HH19-22 (Abb. 3.11b u. c) wird *Fli-I* gleichmäßig in cerebralen Geweben und in den diese umgebenden Bindegewebszellen exprimiert. In älteren Stadien, wie z.B. Stadium HH30 (Abb. 3.11d-e) lässt sich bereits in Tel- und Diencephalon eine Gewebeschichtung erkennen. Die Stärke der Expression erhöht sich dabei auf luminaler Seite (vgl. Kap. 3.2.2.2).

In der Abbildung 3.12 ist deutlich zu erkennen, dass sich die stärkste Expression im Rückenmark in dessen ventrikulärer Schicht befindet. Hierbei handelt es sich um die ependymale Zellschicht, die den Canalis centralis umschließt.

Die den Canalis centralis auskleidenden Ependymzellen sind als langgestreckte, bewegliche Zellen auf ein ausgeprägtes Zytoskelett angewiesen. Es ist daher denkbar, dass die starke Expression von *Flightless-I* in diesen Zellen mit Aktinfasern kolo-kalisiert, wie es auch in neuronalen Zellkörpern, in Neuriten und in deren Filopodien und Wachstumskegeln bereits beschrieben wurde (Davy et al., 2000).

Desweiteren zeigt sich eine deutliche Aktivität von *Flightless-I* in den Nervenzellkörpern der grauen Substanz. In der weißen Substanz des Rückenmarks konnten im Hühnchen vereinzelte Areale beobachtet werden, die *Fli-I* exprimieren. Teilweise handelt es sich dabei um fokale Bezirke und teilweise zeigt sich die Expression, besonders im Bereich der Ventralhörner, in langgestreckten Faserzügen (Abb. 3.12 b).

Es ist durchaus denkbar, dass es sich bei der Expression in der weißen Substanz um Axone bzw. deren Wachstumskegel handelt. Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann eine Expression in den Myelinscheiden ausgeschlossen werden. Anzumerken ist, dass es sich bei der hier

durchgeführten Studie um einen mRNA-Nachweis handelt und nicht um eine Analyse des Proteins von *Flightless-I*. Das Vorliegen von mRNA und das Vorhandensein des Proteins eines solchen Gens können sich deutlich voneinander unterscheiden. Deshalb lässt sich über die Proteinverteilung an dieser Stelle nur spekulieren. Für endgültige Aussagen über eventuelle Parallelen zwischen den hier vorgelegten Ergebnissen und den Entdeckungen von Davy et al. (2000) sind weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen erforderlich. Um eine Beteiligung von *Flightless-I* an den Umstrukturierungsprozessen des Aktinzytoskeletts zu überprüfen, sollte die Lokalisation des *Flightless-I*-Proteins in den oben genannten Geweben mit Hilfe eines geeigneten Antikörpers ermittelt werden, bei gleichzeitiger Phalloidin-färbung der Aktinfilamente. In Zellkulturanalysen könnte so die Lokalisation des *Flightless-I*-Proteins in lebenden Zellen sichtbar gemacht werden und zeitgleich Vergleiche mit dem Aktinzytoskelett ermöglichen.

#### **4.4. Expression von *Flightless-I* in der Muskulatur**

##### **4.4.1 Rumpf**

Im menschlichen Körper fand sich die stärkste Expression von *Flightless-I* in der Skelettmuskulatur, gefolgt von Herz und Lunge (Campbell et al. 1997). Es handelt sich dabei um Organe, die einen Reichtum an Aktin aufweisen.

In der Entwicklung des Hühnchens konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Bereits in den Somiten, den frühen Anlagen von Muskulatur, Haut und Skelett, findet sich eine deutliche Expression von *Flightless-I*. Im wachsenden Organismus zeigt sich eine überaus starke Expression in der Skelettmuskulatur, in der glatten Muskulatur aber auch in anderen Organen, die reich an Muskelfasern sind, wie z.B. Herz und große Körpergefäße. Wie bereits im Jahr 2000 von Davy beschrieben, deutet auch dies auf eine Kolo-kalisation zwischen Aktin und *Flightless-I* hin.

In Hohlorganen, bestehend aus glatter Muskulatur, wie z.B. dem Muskelmagen, Darm und Ovidukt, zeigt sich eine unterschiedliche Expression in den Zellen der einzelnen Muskelschichten. Dies kann zum einen an der Ausrichtung der Zellen liegen, zum anderen kann es aber auch Ausdruck einer unterschiedlichen Expressionsintensität in den einzelnen Muskelschichten sein.

In Kapitel 3.2.2.3 „Somiten und Muskulatur“ wird die Veränderung der Expressionsstärke in den Somiten im Laufe der Entwicklung beschrieben. Je nach Alter der Embryonen zeigen sich Verschiebungen in der Intensität der Expression. Diese im „whole mount“ beobachteten Veränderungen konnten in den Querschnitten leider nicht in derselben Weise bestätigt

werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass das Expressionsmuster durch eine unterschiedliche Ausrichtung der einzelnen Zellen innerhalb des Somiten zustande kommt. Zuerst ist der Somit ein sphärisches Gebilde aus Somitenepithel und mesenchymalem Somitocoel. Später findet eine Elongation von dorsomedial nach ventrolateral statt und es entsteht das längliche Dermomyotom (Gilbert, 2006). Diese Umstrukturierungen im Laufe der Entwicklung verlangen eine unterschiedliche Ausrichtung der Zellen.

Unbestreitbar ist die Tatsache, dass es im Dermomyotom tatsächlich zu einem deutlichen Expressionsanstieg gegenüber dem umliegenden Gewebe kommt, der sich an der ventralen Kante noch verstärkt. Diese Verstärkung geht mit der Ausbildung des Myotoms einher und zeigt, dass *Flightless-I* eine essentielle Rolle bei der Entwicklung der Muskulatur im Wirbeltier inne zu haben scheint.

In Abbildung 3.10.d zeigt sich eine Signalverstärkung am dorsalen Randbereich des Neuralrohrs und der Somiten. Aus dem dorsalen Teil der Somiten entsteht im Laufe der Entwicklung das Dermomyotom. Das dorsale Neuralrohr ist mit der Expression von Wnt-1 und Wnt-3a an der Entstehung des Dermomyotoms beteiligt (Yusuf und Brand-Saberi, 2006). Beides sind Strukturen bzw. Vorgänge, die in Kooperation mit *Flightless-I* stehen. Allerdings zeigt sich beim Vergleich vieler Schnittbilder diese Signalverstärkung nicht durchgehend und taucht desweiteren auch an den lateralen Rändern des Neuralrohrs und an dessen lumenseitiger Begrenzung auf. Deshalb ist hier mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass es sich dabei um Krümmungsartefakte dieser dreidimensionalen Strukturen handelt, in denen mehrere dicht hintereinander liegende Zellen eine gesteigerte Expression vortäuschen.

#### 4.4.2 Gliedmaßen

Ein sehr interessantes Phänomen zeigte sich bei der Untersuchung der Gliedmaßen: Die Expression von *Flightless-I* in den Extremitäten ergibt zunächst eine homogene Färbung in den kleinen und mittleren Stadien. Jedoch beginnt sich das Bild in den älteren Embryonen drastisch zu wandeln. Eine Expression ist nach wie vor in allen Geweben der Extremitäten zu erkennen, aber es zeigt sich deutlich eine Erhöhung der Expression in bestimmten Arealen. Diese Signalverstärkungen finden sich stets in den dorsolateralen und apikalen Bezirken der Flügel und Beine. In der Vergrößerung von Abbildung 3.16.m ist entlang der Dermis eine scharf gefärbte Linie zu erkennen, von der aus sich die Expression dorsal und apikal teilweise ein Stück weit in die Dermis hinein Richtung zukünftiger Subkutis zieht, während das Ektoderm bis auf den Bereich der apikalen Wachstumszone ungefärbt bleibt. Dieses Bild der Expression zeigt sich ebenfalls an der Lateralseite des Rumpfes und der wachsenden Extremitäten, genau wie dorsolateral oberhalb des Neuralrohrs (Abb. 3.16.o und p).

Diese Beobachtungen gehen keineswegs konform mit definierten Muskelstrukturen. Die apikale Wachstumszone, die wie hier gezeigt ebenfalls *Flightless-I* exprimiert (Abb. 3.16m), exprimiert auch den „*fibroblast growth factor*“ (FGF) (Robson und Hughes, 1996) und reguliert die Expression des „*scatter factors*“ im darunterliegenden Mesenchym (Scaal et al., 1999). Prämyogene Zellen exprimieren *Pax3* und migrieren distalwärts zur apikalen Wachstumszone. Zellen, die zu Muskelzellen differenzieren, beginnen mit der Expression der Muskelregulationsfaktoren *Myf5* und *MyoD*. Sie liegen meist etwas proximal und im Zentrum der Extremitätenknospe, während proliferierende, *Pax3* exprimierende Zellen, näher am Ektoderm liegen (Francis-West et al., 2003). „Bone morphogenetic protein“ (BMP) aus dem Ektoderm und dem darunter liegenden Mesenchym unterdrücken zusammen mit „scatter factor“ aus dem Mesenchym und den FGFs in der apikalen Wachstumszone die myogene Differenzierung (Francis-West et al., 2003). Solche Mechanismen sind von äußerster Wichtigkeit, um prämatüre Differenzierungsvorgänge zu unterdrücken, die fatale Entwicklungsstörungen nach sich ziehen können.

Die Expression von *Flightless-I* zeigt sich in Bereichen in denen auch „BMPs“ und „scatter factor“ exprimiert werden (Robson und Hughes, 1996; Scaal et al., 1999). Außerdem liegt die Expression gleichzeitig in den äußeren Randbereichen, in denen normalerweise proliferierende und noch nicht differenzierte Zellen liegen (Francis-West et al., 2003). Desweiteren blieb nach Überexpression von *Flightless-I* im medialen Dermomyotom die Elongation der Muskelzellen in diesem Bereich aus und es kam gleichzeitig zu einer Hochregulierung von *Pax3*, einem Marker für proliferierende Myoblasten (Amthor et al., 1998), was auf ein undifferenziertes Zellstadium hindeutet. Selbstverständlich bedarf es zukünftiger Untersuchungen, um etwaige Deckungsgleichheiten in den Expressionsbereichen der verschiedenen Entwicklungsfaktoren zu ermitteln, wie etwa kombinierter immunhistochemischer Proteinstudien. Aber die hier bereits gewonnenen Erkenntnisse lassen eine Interaktion von *Flightless-I* mit den genannten Entwicklungsfaktoren stark vermuten. Eventuell ist *Flightless-I* ein weiterer Faktor, der in manchen embryonalen Geweben der prämaturen Differenzierung von Zellen entgegenwirkt.

Bei der Untersuchung der Gliedmaßen fand sich eine weitere interessante Entdeckung: *Flightless-I* scheint auch eine Rolle in der Entwicklung des Knorpels bzw. des Knochens inne zu haben. Sämtliche Knorpelstrukturen exprimieren *Flightless-I*. Dabei auffallend ist, dass das Signal besonders stark in jungem Knorpel exprimiert wird. Je weiter distal der Schnitt erfolgt, desto stärker und homogener zeigt sich die Färbung. Proximalwärts, wo der Knorpel dicker und im Zuge der Entwicklung auch reifer wird, schwindet das Signal von *Flightless-I* zunehmend aus dem Zentrum der Digiti, bis es schließlich im reiferen Knorpelskelett fast nur noch auf einen peripheren Randbereich begrenzt ist (Abb. 3.14).



In der Entwicklung geht das Skelett aus dem lateralen Seitenplattenmesoderm durch enchondrale Ossifikation hervor. Dabei entsteht zunächst Knorpel, der später sukzessiv durch Knochen ersetzt wird (Horton, 1990). Zunächst werden unter dem Einfluss von Sonic hedgehog (Shh) mesenchymale Zellen zu Knorpelzellen bestimmt. Weiter werden, induziert durch Shh, Sklerotomzellen zur Expression von Pax1 angeregt (Cserjesi et al., 1995; Sasic et al., 1997). In einer zweiten Phase kondensieren die ausgewählten Mesenchymzellen zu kompakten Kalknadeln und differenzieren zu Chondrozyten. BMPs sorgen in diesem Stadium für die Expression der Adhäsionsmoleküle N-Cadherin und N-CAM und des Transkriptionsfaktors Sox9 (Oberlender und Tuan, 1994; Hall und Miyake, 1995). Im dritten Schritt proliferieren die Chondrozyten und formen ein knorpeliges Modell des späteren Knochens vor. Bei der Teilung sezernieren sie die Knorpel-spezifische Extrazellulärmatrix (Gilbert, 2006). In der vierten Phase hören die Chondrozyten auf sich zu teilen und werden unter dem Einfluss von Runx2 zu hypertrophen Chondrozyten, indem sie drastisch ihr Volumen vergrößern. Durch Änderungen in der sezernierten Matrix kommt es langsam zur Mineralisation und die Knochen beginnen zu kalzifizieren. In der letzten Phase sprossen, induziert durch „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF), Blutgefäße in das Knorpelmodell ein. Sobald die hypertrophen Chondrozyten absterben, differenzieren die das knorpelige Modell umgebenden Zellen zu Osteoblasten und ersetzen die Chondrozyten. Diese Vorgänge spielen sich zuerst im Zentrum der Knochen ab. An den Epiphysen bilden sich dann etwas später sekundäre Ossifikationszentren (Gilbert, 2006).

Die Entstehung des Knochens beruht also auf zunächst proliferierenden, dann hypertrophischen und schließlich mineralisierenden Chondrozyten. Bei genauerer Betrachtung lässt sich erkennen, dass *Flightless-I*-exprimierende-Zellen häufig mehrere Zellkerne aufweisen (Abb. 3.14.e). Die Expression schwindet mit zunehmendem Wachstum und Reifung des Knorpels. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den *Flightless-I*-exprimierenden-Bezirken um eine Art Knorpelproliferationszone handelt. Zum einen könnte seine Aktivität in proliferierenden Zellen dadurch erklärt werden, dass diese Zellen eine besonders hohe Aktivität in den Zellkernen und Teilungsspindeln aufweisen – beides Strukturen in denen *Flightless-I* eine Rolle zu spielen scheint. Zum anderen deutet auch dies wiederum darauf hin, dass *Fli-I* eines der Gene ist, das in bestimmten Geweben für die Proliferation embryonaler Zellen verantwortlich ist und unter Umständen prämaturer Differenzierung entgegenwirkt.

Während der Entwicklung der Muskulatur entstehen schnelle und langsame Muskelfasern (Francis-West et al., 2003). Wnt-5a fördert die Entwicklung der langsamen Muskelfasern. Es wird zunächst überall im Mesenchym exprimiert, aber später zieht sich die Expression auf die unmittelbare Umgebung chondrogener Kerne zurück, wo die Mehrheit an langsamen Muskelfasern zu finden ist. Wnt-11 dagegen wird im subektodermalen Mesenchym

exprimiert, wo die Mehrheit der schnellen Muskelfasern liegt (Anakwe et al., 2003). So könnte die unregelmäßige und bis jetzt noch nicht eindeutig erklärbare Expression von *Flightless-I* in den Gliedmaßen unter Umständen auch im Zusammenhang mit verschiedenen Fasertypen stehen und gleichzeitig eine Interaktion mit dem Wnt-Signalweg anzeigen.

Um diese Vermutungen zu untersuchen, sollten weitere Analysen folgen. Es empfiehlt sich, genauere Studien über die Verteilung von *Flightless-I* und dessen Protein in der Muskulatur und in Knochen und Knorpel durchzuführen, bspw. mit Vergleichen durch Spezialfärbungen wie Alzianblau- oder Alizarinrot-Färbung in histologischen Schnitten und Zellkulturanalysen.

#### 4.5. *Flightless-I* und Thymosin $\beta$ -15

Zu Beginn der Untersuchungen stand die Frage nach Gemeinsamkeiten in der Rolle von Thymosin $\beta$ -15 und *Flightless-I* während der Embryonalentwicklung. Es wurden neue Einblicke in die zellulären Prozesse dieser Gene erhofft, die über Aktin-Bindung gesteuert werden. Desweiteren wurde auf etwaige Verbindungen zum Smith-Magenis-Syndrom aufmerksam gemacht.

Die Gemeinsamkeiten von Thymosin $\beta$ -15 und *Flightless-I* liegen nicht in gleichgerichteten Funktionen, sondern vielmehr in ihren entgegengesetzten Einflüssen auf dieselben Entwicklungsfaktoren. Während Thymosin $\beta$ -15 nach Überexpression zu einer Verschmelzung der Myotome und einer Hochregulierung von *MyoD*, *Myf5* und *Pax3* führt, veranlasst ein Knockdown dieses Gens das Ausbleiben der Elongation von Myotomzellen und die Herunterregulierung von *MyoD* und *Myf5* (Rudloff, Diplomarbeit 2006). *Flightless-I* dagegen verursacht nach Überexpression ein Ausbleiben der Elongation von Myotomzellen und sorgt für eine Herunterregulierung von *MyoD*, *Myf5* und *Myogenin*, wohingegen *Pax3* und *Cdc42* eine Hochregulierung erfahren. Es wird daher für zukünftige Untersuchungen von großem Interesse sein, mit Hilfe von RNAi-Konstrukten Knockdownstudien durchzuführen und eventuell die entgegengesetzten Wirkungsweisen beider Gene weiter zu komplettieren. Sowohl Thymosin $\beta$ -15 als auch *Flightless-I* scheinen als Aktin-bindende Gene eine entscheidende Rolle in der Myogenese zu spielen. An Hand der Morphologie und der untersuchten Markermoleküle konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach Überexpression von *Flightless-I* in einem unreifen, nicht differenzierten Stadium verharren und nicht mehr in der Lage sind zu elongieren und Muskelfasern auszubilden. Durch das „Nichtelongieren“ der Myotomzellen wird die Myotomentwicklung bzw. -entstehung gestört und es kann kein regelrechtes Myotom mehr gebildet werden.

*Flightless-I* geht mit seiner Expression in sämtlichen Organen des Körpers weit über die Expressionsbereiche von Thymosin $\beta$ -15 hinaus (Dathe, Doktorarbeit 2004). Dafür

verantwortlich ist wahrscheinlich, außer seiner Fähigkeit Aktin zu binden, vor allem seine Rolle in der Protein-Protein-Interaktion und ist somit auch im Bereich der Transkriptionskontrolle zu suchen (Kwiatkowski, 1999; Liu und Yin, 1998). Das Ausbleiben der Elongation und damit das Verharren der Myotomzellen in einem unreifen Stadium weist auf eine Rolle für *Flightless-I* hin, die eventuell embryonale Zellen vor prämaturer Differenzierung schützt. Dies zeigt sich ebenso in der Tatsache, dass es durch seine Anwesenheit die Muskeldeterminationsfaktoren *MyoD*, *Myf5* und *Myogenin* herunterregulieren kann.

Im Zuge der Embryonalentwicklung exprimieren Muskelvorläuferzellen im Dermomyotom *Pax3*, einen Marker für proliferierende Myoblasten (Yusuf und Brand-Saberi, 2006; Amthor et al., 1998). *Pax3* agiert upstream von *MyoD*, *Myf5* und *Myogenin* (Maroto et al., 1997). Nach der Translokation ins Myotom treten die Zellen in die Differenzierungsphase ein und hören auf *Pax3* zu exprimieren. Stattdessen beginnen sie mit der Expression der Muskeldeterminationsfaktoren *MyoD* und *Myf5*. Im Hühnchen wird dabei zuerst *Myf5* aktiv (Ahmed et al., 2006), welches die Expression von *MyoD* aktivieren kann. *MyoD* agiert hauptsächlich in der Differenzierung von Myoblasten (Tajbakhsh et al., 1996; Maroto et al., 1997). Downstream von *Myf5* und *MyoD* wird *Myogenin* aktiv (Brand-Saberi und Christ, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *MyoD* im dorsomedialen Somiten durch Wnt-1 und Wnt-3a aus dem dorsalen Neuralrohr und durch Shh-Signale aus dem ventralen Bereich des Neuralrohrs und der Chorda dorsalis angestoßen wird (Münsterberg et al., 1995). Nach Überexpression von *Flightless-I* bleibt die Elongation der Myotomzellen in diesem Bereich aus (vgl. Kap. 3.3.2.7) und *Pax3* erfährt eine Hochregulierung (vgl. Kap. 3.3.2.4). Beides zusammen deutet auf ein undifferenziertes, proliferierendes Zellstadium hin. Eine Bestätigung des Ausbleibens der Differenzierungsphase findet sich in der Herunterregulierung von *MyoD*, *Myf5* und *Myogenin* (vgl. Kap. 3.3.2.1-3.3.2.3). Gleichzeitig könnte die Herunterregulierung von *MyoD* durch eine verstärkte Negativregulierung des Wnt-Signalwegs nach *Flightless-I*-Überexpression erklärt werden.

Der für Embryonalentwicklung, Achsenformation und Gewebeentwicklung unerlässliche Wnt-Signalweg steht in direktem Zusammenhang mit *Flightless-I* (Liu et al., 2005; Lee und Stallcup, 2006). Nach der Aktivierung des Wnt-Signalwegs erfolgt im Zellkern eine  $\beta$ -Catenin abhängigen Transkription. Durch exogene Zufuhr von FLAP1 wird diese  $\beta$ -Catenin-abhängige Transkription aktiviert, jedoch durch Fli-I inhibiert. FLAP1 interagiert dabei direkt mit  $\beta$ -Catenin, GRIP1 und p300 und verstärkt dadurch deren Aktivität. Indem FLAP1 die Transkriptionsaktivierung durch  $\beta$ -Catenin und LEF1/TCF unterstützt ergibt sich ein Synergismus zwischen FLAP1 und p300. *Flightless-I* hingegen unterbricht diese Synergie von FLAP1 mit p300 und  $\beta$ -Catenin (Lee und Stallcup, 2006). Diese entgegengesetzten Effekte von FLAP1 und Fli-I lassen eine wichtige Schlüsselrolle im Wnt-Signalweg vermuten. Die durch

Mutationen von *Flightless-I* ausgelösten Entwicklungsstörungen, wie die Flugunfähigkeit bei *Drosophila melanogaster*, könnten so auf eine Fehlregulation im Wnt-Signalweg zurückgeführt werden (Lee and Stallcup, 2006). Eine solche Fehlregulation könnte aber unter anderem auch für die Vorkommnisse des Smith-Magenis-Syndrom verantwortlich sein. Aus diesem Grund sind Manipulationen an diesem Gen als mögliches „drug target“ in der Wundheilung (Cowin et al., 2007) mit äußerster Vorsicht zu betrachten. Die Aktivierung des Wnt-Signalweges in adulten Geweben spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Tumoren (Logan und Nusse, 2004). *Flightless-I* könnte deshalb auch im Zuge eines negativen Feedbacks vor überschießenden Reaktionen schützen und so eine wichtige Schutzfunktion erfüllen.

Nach Überexpression von *Flightless-I* steigt analog die Expression von *Cdc42* drastisch an. Die Mitglieder der kleinen GTPasen weisen in ihrer Lokalisation eine auffällige Parallelität mit *Flightless-I* auf. So lokalisiert beispielsweise *Cdc42* in der Hauptsache ebenfalls in perinukleären Regionen und breitet sich auch in stimulierten Zellen entlang eines filamentösen Netzwerkes aus (Davy et al., 2000). Fli-I und Ras kolokalisieren an Aktin-Bögen an den Leitkanten der Zellen. RhoA und Fli-I kolokalisieren an Aktin-Bögen an der Aktinreichen Leitkante von motilen Fibroblasten. RhoA lokalisiert gleichfalls mit Membrankräuselungen, die mit Lamellopodien assoziiert sind. Nach Translokation aus dem Nukleus lokalisiert Fli-I mit Aktin-basierten Strukturen. Hierbei scheint Fli-I nicht das Aktinnetzwerk der Zelle zu nutzen (Davy et al., 2000). Eine solche Verknüpfung zwischen *Flightless-I* und den Mitgliedern der kleinen GTPasen könnte in der Elongation von Zellen – und somit in der Regulation des Aktinzytoskeletts – eine entscheidende Rolle spielen und daher den Expressionsanstieg von *Cdc42* nach Überexpression von *Flightless-I* erklären.

Die gefundenen Effekte nach Überexpression von *Flightless-I* können deshalb sowohl auf eine Interaktion mit dem Aktinzytoskelett, als auch auf Differenzierungsprozesse zurückgeführt werden. Es empfiehlt sich, in zukünftigen Untersuchungen Knockdownstudien und Proteinanalysen in elongierten und nicht elongierten Myoblasten durchzuführen bei gleichzeitiger Phalloidinfärbung des Aktinzytoskeletts.

Bei den Überexpressionsversuchen traten bei *MyoD* zwei abweichende Ergebnisse auf. Diese augenscheinliche Hochregulierung von *MyoD* in zwei Embryonen kann folgendermaßen erklärt werden: Durch die Überexpression von *Flightless-I* kann kein regelrechtes Myotom mehr gebildet werden. Die Zellen exprimieren aber nach wie vor *MyoD* und das auch stark. Dennoch sind sie nicht mehr in der Lage zu elongieren und zeigen so artefaktisch eine punktuelle Hochregulierung, die aber nicht der Realität entspricht.

#### 4.6. Smith-Magenis-Syndrom

Orthologe von *Flightless-I* finden sich in Mensch, Maus und *C.elegans* (Campbell et al., 1993; Campbell et al., 2000). In *Drosophila melanogaster* wird *Flightless-I* in Muskulatur, Gehirn, Auge und vielen anderen Organen exprimiert. In *C.elegans* findet es sich im Eiablageapparat, in der Entwicklung der Keimzellen und in der Muskulatur von Pharynx, Rektum, Vulva und Proktodeum (Lynch et al., 1995; Deng et al., 2007). Im Menschen wird *Flightless-I* in Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere und Pankreas exprimiert (Campbell et al., 1997). Im Hühnchen fand sich *Fli-I* in allen untersuchten Geweben: Hensenscher Knoten, Primitivstreifen, Auge, Ohr, Pharyngealbögen, Haut, Federn, Herz, Blutgefäße, Knorpel, Chorda dorsalis, Leber, Lunge, Neuralrohr, Gehirn, Rückenmark, Ganglien, Niere, Ovidukt, Somiten, Muskulatur und Darm. Zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung war die Expression von *Flightless-I* in diesen Organen nachweisbar. Nur aus reiferem Knorpel- und Lebergewebe schwand die Expression. Vor allem in muskelreichen, und somit Aktin-reichen, und in neuronalen Geweben findet sich eine starke Expression.

In *Drosophila melanogaster* führten heterozygote Mutationen zu Defekten in der Muskelentwicklung (Miklos und De Couet, 1990). In „loss-of-function“-Studien bei der Fruchtfliege kam es zu Entwicklungsstörungen der Pilzkörper (Kremer, Diplomarbeit 2007). *Flightless-I* steht im Verdacht am Smith-Magenis-Syndrom des Menschen beteiligt zu sein. Patienten mit SMS weisen sowohl Defekte in der Entwicklung des Gehirns, als auch in der Entwicklung der Skelettmuskulatur auf. In der hier durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass sämtliche Organe eine Expression von *Flightless-I* aufweisen. Menschen mit SMS-Syndrom leiden an einer Vielzahl von Defekten in den einzelnen Organen, in denen auch *Flightless-I* während der Emryonalentwicklung aktiv ist (siehe Abb. 1.3). Da *Flightless-I* im kritischen Bereich von Chromosom 17 lokalisiert werden konnte (Smith et al., 1986), genau in dem Bereich in dem Patienten mit SMS Deletionen aufweisen, erhärtet sich der Verdacht einer Beteiligung von *Flightless-I* am SMS-Syndrom.

Leider konnten in dieser Dissertation keine neuen Einblicke in Richtung der Aufklärung zytologischer Ursachen des Smith-Magenis-Syndroms gewonnen werden. Um dieses vielschichtige Syndrom genauer zu beleuchten, bedarf es zukünftiger Studien, nicht zuletzt auch deshalb, weil *Flightless-I* ein noch recht wenig erforschtes Gen ist, das in zahlreichen biologischen Strukturen und Vorgängen eine Rolle zu spielen scheint, was die Isolierung der einzelnen Funktionen für den embryonalen Entwicklungsprozess enorm erschwert. Zusammenfassend kann allerdings gesagt werden, dass die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit aus normaler Expression und Überexpression von *Flightless-I*, eine Störung der normalen Muskelentwicklung zeigen, was die Annahme einer hochkonservierten Funktion dieses „Brücken-Gens“ über die einzelnen Spezies hinweg bestätigt. Deletionen von *Flightless-I* im

---

Genom des Menschen sind mit Sicherheit für das SMS-Syndrom mitverantwortlich und veranschaulichen die zentrale Funktion dieses Gens für den Organismus.



## 5. Deutsche Zusammenfassung

Das Ziel der hier vorgelegten Arbeit war die nähere Erforschung des hochkonservierten Gens *Flightless-I* während der Embryonalentwicklung im Wirbeltier.

Flightless-I gehört zur Gelsolin-Superfamilie Aktin-bindender Proteine und besitzt Orthologe bei Mensch, Maus, *C. elegans* und *D. melanogaster*. Das Protein von Flightless-I weist zwei funktionale Domänen auf: Zum einen die Aktin-bindende Gelsolin-ähnliche Domäne (GLD) und zum anderen eine leucine-rich repeat Domäne (LRR), die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist. Auf diese Weise verknüpft Flightless-I zwei wichtige Proteinfamilien. Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass es so eine Brücke zwischen dem Aktinzytoskelett und bisher noch nicht identifizierten Molekülen der Signaltransduktion darstellt. Desweiteren wird für Flightless-I eine Beteiligung an der Entstehung des Smith-Magenis-Syndroms(SMS) vermutet.

Bei Untersuchungen in *D. melanogaster* wiesen Manipulationen von Flightless-I (Gelsolin-Familie) und Ciboulot (WASP-Familie, Pendant zum Thymosin der Wirbeltiere) erstaunliche Parallelen auf. Bei Untersuchungen im Hühnerembryo stellte sich für *Thymosin $\beta$ -15* eine wichtige Rolle in der Muskelentwicklung heraus.

Bisher existierten für die Expression von *Flightless-I* in Wirbeltieren nur Untersuchungen mittels „Northern blotting“. Es gab jedoch keinerlei morphologische Untersuchungen über die Verteilung dieses Gens in vivo. Mittels In-situ-Hybridisierung wurden nun die verschiedenen Entwicklungsstadien des Hühnchens untersucht. Es zeigte sich, dass *Flightless-I* in sämtlichen Organen exprimiert wird. SMS-Patienten weisen in vielen Organen schwere Störungen auf, was den Verdacht der Beteiligung von *Flightless-I* an diesem Syndromenkomplex erhärtet.

In Überexpressionsversuchen mit einem eigens konstruierten Vektor stellte sich heraus, dass Flightless-I in seiner dualen Rolle ebenso wie Thymosin $\beta$ -15 eine entscheidende Rolle in der Myogenese inne zu haben scheint.

Die Gemeinsamkeiten von *Thymosin $\beta$ -15* und *Flightless-I* liegen nicht in gleichgerichteten Funktionen, sondern vielmehr in ihren entgegengesetzten Einflüssen auf dieselben Entwicklungsfaktoren. Während *Thymosin $\beta$ -15* nach Überexpression zu einer Verschmelzung der Myotome und einer Hochregulierung von *MyoD*, *Myf5* und *Pax3* führt, veranlasst ein Knockdown dieses Gens das Ausbleiben der Elongation von Myotomzellen und die Herunterregulierung von *MyoD* und *Myf5*. *Flightless-I* dagegen verursacht nach Überexpression ein Ausbleiben der Elongation von Myotomzellen und sorgt für eine Herunterregulierung von *MyoD*, *Myf5* und *Myogenin*, wohingegen *Pax3* und *Cdc42* eine Hochregulierung erfahren.

---

Anhand der Morphologie und der hier untersuchten Markermoleküle konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach Überexpression von *Flightless-I* in einem unreifen, nicht differenzierten Stadium verharren und nicht mehr in der Lage sind zu elongieren und Muskelfasern auszubilden. Durch das „Nichtelongieren“ der Myotomzellen wird die Myotomentwicklung bzw. -entstehung gestört und es kann kein regelgerechtes Myotom mehr gebildet werden.

## 6. English summary

The aim of this work presented here was to investigate the role of the highly conserved gene „*flightless-I*“ during the embryogenesis of vertebrates.

Flightless-I belongs to the gelsolin-superfamily of actin-binding proteins. It has orthologues in human, mouse, *C.elegans* and *D. melanogaster*. The protein of fli-I has two functional domains. On the one hand the actin-binding gelsolin like domain (GLD) and on the other hand the leucine rich repeat domain (LRR) which is involved in protein-protein interactions. In that way flightless-I brings together two important protein families. Until now many experiments point out a role for fli-I in bridging the actincytoskeleton with not yet identified molecules of signal transduction. Moreover, there is suggested a role for *flightless-I* in the onset of Smith-Magenis syndrome (SMS).

Interesting parallels were found after manipulations of flightless-I (gelsolin family) and Ciboulot (WASP-family, homologue of thymosin in vertebrates) in *D. melanogaster*. In the experimental work using the chicken embryo it was shown that *thymosin $\beta$ -15* plays an important role in muscle development.

Until now there were no histological investigations about *flightless-I* in vivo. Only Northern blotting experiments were done. With the technique of in-situ-hybridisation different stages of the chicken embryo were analyzed. It was shown that *flightless-I* is expressed in every organ. Also patients with SMS show severe defects in many organs. This is confirming a role for *flightless-I* in SMS.

With the help of an overexpression plasmid it was found out a role for *flightless-I* in myogenesis as well as for *thymosin $\beta$ -15*.

The common findings of *thymosin $\beta$ -15* and *flightless-I* are not in the same way of functioning, in fact in the opposite influence on the same developmental factors. Whereas overexpression of *thymosin $\beta$ -15* shows a fusion of myotome over somitic borders and an upregulation of *MyoD*, *Myf5* and *Pax3*, a knockdown impedes the elongation of myotomal cells and causes a downregulation of *MyoD* and *Myf5*. In contrast *flightless-I* impedes an elongation of myotomal cells after overexpression and causes a downregulation of *MyoD*, *Myf5* and *Myogenin*, whereas *Pax3* and *Cdc42* are upregulated.

The morphology and the marker molecules investigated here demonstrate that after overexpression of *flightless-I* the cells are remaining in an undifferentiated state and are not able to elongate and to form muscle fibers. In that way the development of the myotome is defective.

## 7. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Martin Bergmann, der sich bereit erklärte, die Rolle des Doktorvaters zu übernehmen und mich bei der Promotion außerhalb der Fakultät unterstützt hat.

Besonders danken möchte ich Frau Prof. Dr. Beate Brand-Saberi, die mir die Gelegenheit gab, in ihrem Labor an einem sehr interessanten und anschaulichen Thema zu arbeiten. Darüberhinaus möchte ich ihr für ihre Unterstützung in der Auswahl und Bearbeitung der ausgewählten Arbeiten danken.

Herzlichen Dank auch an Dr. Fangping Dai für die Analyse der bioinformatischen Daten in molekularbiologischen Belangen.

Desweiteren danke ich herzlich Gabriela Morosan-Puopolo für ihre Kooperation und Hilfe bei der Erlernung der Techniken und Unterstützung in der Konstruktion der Plasmide.

Vielen Dank an Alexander Bonafede und Anton Gamel, die mir mit zahlreichen Tipps wertvolle Hinweise für die praktischen Ausführungen gaben, und auch an Ulrike Pein, Ellen Gimpel, Susanna Glaser und Lidia Koschny für ihre hervorragende technische Unterstützung. Darüberhinaus bedanke ich mich herzlich bei Nargis Khalida und Rizwan Rehimi für ihre wissenschaftliche Unterstützung und vor allem für die wunderbare Freundschaft. Danken möchte ich auch Susanne Philippi für die gute Zusammenarbeit sowie allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Brand-Saberi für die Beteiligung an der guten und freundschaftlichen Arbeitsatmosphäre im Labor.

Nicht zuletzt danke ich besonders herzlich meiner Familie, meinen Eltern, Udo und Karin Redinger, für ihre unermüdliche Unterstützung und ihre Großzügigkeit in allen Lebens- und Arbeitsbereichen, meinen Großeltern, Gotthilf und Elfriede Büchle, für ihre Begleitung und ihr Interesse an allen Unternehmungen. Und meinem lieben Mann, Björn Kraus, für seine technische Unterstützung, aber vor allem für seine Geduld und Liebe.

## 8. Literaturverzeichnis

- Adams, D. H., Strudwick, X. L., Kopecki, Z., Hooper-Jones, J. A., Matthaei, K. I., Campbell, H. D., Powell, B. C. und Cowin, A. J., (2008). Gender specific effects on the actin-remodelling protein Flightless I and TGF- $\beta$ 1 contribute to impaired wound healing in aged skin. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(8): 1555-1569.
- Ahmed, M. U., Cheng, L., und Dietrich, S., (2006). Establishment of the Epaxial-Hypaxial Boundary in the Avian Myotome. *Dev Dyn* 2006; 235: 1884-1894.
- Amthor, H., Christ, B., Weil, M. und Patel, K., (1998). The importance of timing differentiation during limb muscle development. *Curr Biol* 1998; 8: 642-52.
- Anakwe, K., Robson, L., Hadley, J., Buxton, P., Church, V., Allen, S., Hartmann, C., Harfe, B., Nohno, T., Brown, A. M. C., Evans, D. J. R. und Francis-West, P., (2003). Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing. *Development* 2003; 130, 3503-3514.
- Archer, S. K., Behm, C. A., Claudianos, C. und Campbell, H. D., (2004). The Flightless I protein and the gelsolin family in nuclear hormone receptor-mediated signalling. *Biochem Soc Trans* 2004; 32(6): 940-942.
- Archer, S. K., Claudianos, C. und Campbell, H. D., (2005). Evolution of the gelsolin family of actin binding proteins as novel transcriptional coactivators. *BioEssays* 2005; 27: 388-396.
- Birchmeier, C. und Brohmann, H., (2000). Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 725-730.
- Boquet, I., Boujemaa, R., Carlier, M. F. und Preat, T., (2000). Ciboulot regulates actin assembly during *Drosophila* brain metamorphosis. *Cell* 2000; 102: 797-808.
- Brand-Saberi, B. und Christ, B., (1999). Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. *Cell Tissue Res* 1999; 296: 199-212.
- Bryan, B.A., Li, D., Wu, X. und Liu, M., (2005). The Rho family of small GTPases: crucial regulators of skeletal myogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1547-1555.
- Campbell, H. D., Fountain, S., Young, I. G., Claudianos, C., Hoheisel, J. D., Chen, K. S. und Lupski, J. R., (1997). Genomic structure, evolution, and expression of human FLII, a gelsolin and leucine rich-repeat family member: overlap with LLGL. *Genomics* 1997; 42: 266 46-54.
- Campbell, H. D., Fountain, S., Young, C. L., Weitz, S., Lichter, P. und Hoheisel, J. D., (2000). Fliih, the mouse homologue of *Drosophila melanogaster* flightless I gene; nucleotide sequence, chromosomal mapping and overlap with Llg1h. *DNA Sequence* 2000; 11: 29-40.
- Campbell, H. D., Schimansky, T., Claudianos, C., Ozsarac, N., Kasprzak, A. B., Cotsell, J. N., Young, I. G., de Couet, H. G. und Miklos, G. L., (1993). The *Drosophila melanogaster* flightless-I gene involved in gastrulation and muscle degeneration encodes gelsolin-like and leucine-rich repeat domains and is conserved in *Caenorhabditis elegans* and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(23): 11386-11390.
- Chen, K. S., Gunaratne, P. H., Hoheisel, J. D., Young, I. G., Miklos, G. L., Greenberg, F., Shaffer, L. G., Campbell, H. D. und Lupski, J. R., (1995). The human homologue of the *Drosophila melanogaster* flightless-I gene (flil) maps within the Smith-Magenis microdeletion critical region in 17p11.2. *Am J Hum Genet.* 1995; 56(1): 175-182.

- Claudianos, C. und Campbell, H. D., (1995). The novel flightless-I gene brings together two gene families, actin-binding proteins related to gelsolin and leucine-rich-repeat proteins involved in Ras signal transduction. *Mol Biol Evol* 1995; 12: 405–414.
- Cowin, A. J., Adams, D., Strudwick, X., Chan, H., Hooper, J., Sander, G., Rayner, T., Matthaei, K., Powell, B. und Campbell, H. D., (2007). Flightless I deficiency enhances wound repair by increasing cell migration and proliferation. *J Pathol* 2007; 211: 572–581.
- Cserjesi, P., Brown, D., Ligon, K. L., Lyons, G. E., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. und Olson, E. N., (1995). Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development* 1995; 121: 1099–1110.
- Dathe, V., (2004). Charakterisierung entwicklungsspezifisch exprimierter Gene während der Morphogenese beim Vogelembryo. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau. Doktorarbeit 2004.
- Dathe, V. und Brand-Saberi, B., (2004). Expression of thymosin beta4 during chick development. *Anat Embryol (Berl)* 2004; 208: 27-32.
- Davy, D. A., Ball, E. E., Matthaei, K. I., Campbell, H. D. und Crouch, M. F., (2000). The flightless I protein localizes to actin-based structures during embryonic development. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 423–429.
- Davy, D. A., Campbell, H. D., Fountain, S., de Jong, D. und Crouch, M. F., (2000). The flightless I protein colocalizes with actin- and microtubule-based structures in motile Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for the involvement of PI3-kinase and Ras-related small GTPases. *J Cell Sci* 2000; 114(3): 549-562.
- De Couet, H. G., Fong, K. S. K., Weeds, A.G., McLaughlin, P. J. und Miklos, G. L. G., (1995). Molecular and Mutational Analysis of a Gelsolin-Family Member Encoded by the flightless I Gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1995; 141: 1049-1059.
- Deng, H., Xia, D., Fang, B., und Zhang, H., (2007). The Flightless I Homolog, fli-1, Regulates Anterior/Posterior Polarity, Asymmetric Cell Division and Ovulation During *Caenorhabditis elegans* Development. *Genetics* 2007; 177: 847-860.
- Dietrich, S., Abou-Rebyeh, F., Brohmann, H., Bladt, F., Sonnenberg-Riethmacher, E., Yamaai, T., Lumsden, A., Brand-Saberi, B. und Birchmeier, C., (1999). The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development* 1999; 126: 1621-1629.
- Dominguez, R., (2004). Actin-binding proteins – a unifying hypothesis. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 572-578.
- Enkhbayar, P., Kamiya, M., Osaki, M., Matsumoto, T. und Matsushima, N., (2004). Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins* 2004; 54(3): 394-403.
- Epstein, J. A., Shapiro, D. N., Cheng, J., Lam, P. Y. P. und Maas, R. L., (1996). Pax 3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4213-4218.
- Fan, C. und Tessier-Lavigne, M., (1994). Patterning of mammalian somites by dorsal ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell* 1994; 79: 1175-1186.
- Fong, K. S. und de Couet, H. G., (1999). Novel proteins interacting with the leucine-rich repeat domain of human flightless-I identified by the yeast two-hybrid system. *Genomics* 1999; 58: 146–157.



- Franke, W. W., (1993). The intermediate filaments and associated proteins. In: Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins. Oxford University Press 1993; 137-143.
- Francis-West, P. H., Antoni, L. und Anakwe, K., (2003). Regulation of myogenic differentiation in the developing limb bud. *J Anat* 2003; 202: 69-81.
- Gilbert, S. F., (2006). *Developmental Biology*. 8<sup>th</sup> ed. 2006.
- Goshima, M., Kariya, K., Yamawaki-Kataoka, Y., Okada, T., Shibatohe, M., Shima, F., Fujimoto, E. und Kataoka, T., (1999). Characterization of a novel Ras-binding protein Ce-FLI-1 comprising leucine-rich repeats and gelsolin-like domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 111–116.
- Greenberg, F., Guzzetta, V., Montes de Oca-Luna, R., Magenis, R. E., Smith, A. C. M., Richter, S. F., Kondo, I., Dobyns, W. B., Patel, P. I. und Lupski, J. R., (1991). Molecular analysis of the Smith-Magenis syndrome: a possible contiguous-gene syndrome associated with del(17)(p11.2). *Am J Hum Genet* 1991; 49: 1207-1218.
- Greenberg, F., Lewis, R. A., Potocki, L., Glaze, D., Parke, J., Killian, J., Murphy, M. A., Williamson, D., Brown, F., Dutton, R., McCluggage, C., Friedman, E., Sulek, M. und Lupski, J. R., (1996). Multi-disciplinary clinical study of Smith-Magenis syndrome (deletion 17p11.2). *Am J Med Genet* 1996; 62: 247-254.
- Hall, B. K. und Miyake, T., (1995). Divide, accumulate, differentiate: Cell condensations in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol* 1995; 39: 881–893.
- Hamburger, V. und Hamilton, H.L., (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph* 1951; 88 (1): 49-92.
- Homyk, J. R. und Sheppard, D. E., (1977). Behavioral mutants of *Drosophila melanogaster*. I. Isolation and mapping of mutations which decrease flight ability. *Genetics* 1977; 87 (1): 95-104.
- Horton, W. A., (1990). The biology of bone growth. *Growth Genet Horm* 1990; 6(2): 1–3.
- Huxley, H. E., (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science* 1969; 164: 1356-65.
- Kobe, B. und Kajava, A. V., (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 2001; 11: 725–732.
- Kremer, T., (2007). Functional characterization of Flightless I in postembryonic development of *Drosophila melanogaster*. Biologische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau. Diplomarbeit 2007.
- Kwiatkowski, D. J., (1999). Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 103–108.
- Lee, Y. H., Campbell, H. D. und Stallcup, M. R., (2004). Developmentally essential protein flightless I is a nuclear receptor coactivator with actin binding activity. *Mol Cell Biol* 2004; 24(5): 2103-2117.
- Lee, Y. H. und Stallcup, M. R., (2006). Interplay of Fli-I and FLAP1 for regulation of b-catenin dependent transcription. *Nucl Acids Res* 2006; 00: 1–8.
- Lee, W. M. und Galbraith, R. M., (1992). The extracellular actin- scavenger system and actin toxicity. *N Engl J Med* 1992; 326: 1335–1341.
- Liu, J., Bang, A. G., Kintner, C., Orth, A. P., Chanda, S. K., Ding, S. und Schultz, P. G., (2005). Identification of the Wnt signaling activator leucine-rich repeat in Flightless

- interaction protein 2 by a genome-wide functional analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (6): 1927-1932.
- Liu, Y.-T. und Yin, H. L., (1998). Identification of the Binding Partners for Flightless I, A novel protein bridging the leucine-rich repeat and the gelsolin superfamilies. *J Biol Chem* 1998; 14(3): 7920-7927.
- Logan, C. Y. und Nusse, R., (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 781-810.
- Lupas A., (1997). Predicting coiled-coil regions in proteins. *Curr Opin Struct Biol* 1997; 7(3): 388-393.
- Lynch, A. S., Briggs, D. und Hope, I. A., (1995). Developmental expression pattern screens for genes predicted in the *C. elegans* genome sequencing project. *Nature Genetics* 1995; 11(3): 309-313.
- Maleszka, R., De Couet, H. G. und Miklos, G. L. G., (1998). Data transferability from model organisms to human beings: Insights from the functional genomics of the flightless region of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3731-3736.
- Maroto, M., Reshef, R., Münsterberg, A. E., Koester, S., Goulding, M., und Lassar, A. B., (1997). Ectopic pax-3 activates myod and myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue. *Cell* 1997; 89(1):139-48.
- Miklos, G. L. und De Couet, H. G., (1990). The mutations previously designated as flightless-I3, flightless-O2 and standby are members of the W-2 lethal complementation group at the base of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* 1990; 6(3): 133-151.
- Münsterberg, A. E., Kitajewski, J., Bumcrot, D. A., McMahon, A. P. und Lassar, A. B., (1995). Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev* 1995; 9: 2911-2922.
- Oberlender, S. A. und Tuan, R S, (1994). Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development* 1994; 120: 177-187.
- Perrimon, N., Smouse, D. und Miklos, G. L., (1989). Developmental genetics of loci at the base of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1989; 121: 313-331.
- Robson, L.G. und Hughes, S.M., (1996). The distal limb environment regulates MyoD accumulation and muscle differentiation in mouse-chick chimaeric limbs. *Development* 1996; 122: 3899-3910.
- Rudloff, S., (2006). Funktionsanalyse von Thymosin beta15 durch Weiterentwicklung von Überexpressions- und Knockdown-Techniken im Vogelembryo. Medizinischen und Biologische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau. Diplomarbeit 2006.
- Scaal, M., Bonafede, A., Dathe, V., Sachs, M., Cann, G., Christ, B. und Brand-Saberi, B., (1999). SF/HGF is a mediator between limb patterning and muscle development. *Development* 1999; 126: 4885-4893.
- Scaal, M., Gros, J., Lesbros, C. und Marcelle, C., (2004). In ovo electroporation of avian somites. *Dev Dyn* 2004; 229(3): 643-50.
- Silacci, P., Mazzolai, L., Gaucia, C., Stergiopulosa, N., Yin, H. L. und Hayoz, D., (2004). Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2614-2623.

- Smith, A.C., McGavran, L., Robinson, J., Waldstein, G., Macfarlane, J., Zonona, J., Reiss, J., Lahr, M., Allen, L. und Magenis, E., (1986). Interstitial deletion of (17) (p11.2p11.2) in nine patients. *Am J Med Genet* 1986; 24: 393-414.
- Sosic, D., Brand-Saberi, B., Schmidt, C., Christ, B. und Olson, E., (1997). Regulation of paraxis expression and somite formation by ectoderm- and neural tube-derived signals. *Dev Biol* 1997; 185: 229-243.
- Stern, H. M., Brown, A. M. und Hauschka, S. D., (1995). Myogenesis in paraxial mesoderm: preferential induction by dorsal neural tube and by cells expressing Wnt-1. *Development* 1995; 121: 3675-3686.
- Straub, K. L., Stella, M. C. und Leptin, M., (1996). The gelsolin-related flightless I protein is required for actin distribution during cellularisation in *Drosophila*. *J Cell Sci* 1996; 109: 263-270.
- Tajbakhsh, S., Rocancourt, D. und Buckingham, M., (1996). Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. *Nature* 1996; 384:266-268.
- Toulouse, A., Rochefort, D., Roussel, J., Joobert, R. und Rouleau, G. A., (2003). Molecular cloning and characterization of human RAI1, a gene associated with schizophrenia. *Genomics* 2003; 162-171.
- van den Eijnde, S. M., Luijsterburg, A., Boshart, L., De Zeeuw, C. I., van Dierendonck, J. H., Reutelingsperger, C. und Vermeij-Keers, C., (1997). In situ detection of apoptosis during embryogenesis with Annexin V: from whole mount to ultrastructure. *Cytometry* 1997; 29: 313-320.
- Wang, T., Chuang, T. H., Ronni, T., Du, S. Gu. J. C., Cai, H., Sun, H. Q., Yin, H. L., und Chen, X., (2006). Flightless I homolog negatively modulates the TLR pathway. *J Immunol* 2006; 176: 1355-1362.
- Wilson, S. A., Brown, E. C., Kingsman, A. J. und Kingsman, S. M., (1998). TRIP: a novel double stranded RNA binding protein which interacts with the leucine rich repeat of flightless I. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 3460-3467.
- Wirsching, H.-G., (2009). Effekte alterierter Expression von Thymosin $\beta$ -4 auf die Entwicklung des optischen Tektums im Hühnerembryo. Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau. Doktorarbeit 2009.
- Yusuf, F. und Brand-Saberi, B., (2006). The eventful somite: patterning, fate determination and cell division in the somite. *Anat Embryol* 2006; 211 (Suppl. 1): 21-30.